

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Fisiología Animal II



TESIS DOCTORAL

Estudio alergénico de la gamba *Solenocera melanthera*: identificación de nuevos alérgenos y su implicación en la reactividad cruzada con el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Gámez Gámez

Directores

Victoria del Pozo Abejón
Joaquín Sastre Domínguez

Madrid, 2014



ESTUDIO ALERGÉNICO DE LA GAMBA
Solenocera melanthero:
IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS ALÉRGENOS IMPLICADOS
EN LA REACTIVIDAD CRUZADA CON EL ÁCARO
Dermatophagoides pteronyssinus



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO FISIOLÓGIA ANIMAL II



ESTUDIO ALERGÉNICO DE LA GAMBA

Solenocera melantho:

**IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS ALÉRGENOS Y SU IMPLICACIÓN
EN LA REACTIVIDAD CRUZADA CON EL ÁCARO**

Dermatophagoides pteronyssinus

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR
CRISTINA GÁMEZ GÁMEZ,**

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. Victoria del Pozo Abejón

Dr. Joaquín Sastre Domínguez

**IIS-FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA**



MADRID, 2014

Este trabajo ha sido realizado en el IIS-Fundación Jiménez Díaz, en el Departamento de Inmunología, bajo la dirección de la Dra. M^a Victoria del Pozo Abejón y el Dr. Joaquín Sastre Domínguez, con la ayuda de una beca de la Fundación Conchita Rábago y un contrato asociado a un proyecto del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Instituto de Salud “Carlos III” del Ministerio de Ciencia e Innovación.



Doña M^a Victoria del Pozo Abejón, Doctora en Ciencias Biológicas y Adjunta del Departamento de Inmunología del IIS-Fundación Jiménez Díaz,

CERTIFICA:

Que **Doña Cristina Gámez Gámez**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado **“Estudio alérgico de la gamba *Solenocera melanthero*: identificación de nuevos alérgenos y su implicación en la reactividad cruzada con el ácaro *Dermatofagoides pteronyssinus*”**, y que una vez revisado, reúne todos los requisitos exigidos de calidad y originalidad para optar al grado de Doctora.

En Madrid, a 20 de Enero de 2014

Fdo. Dra. M^a Victoria del Pozo Abejón



Don Joaquín Sastre Domínguez, Doctor en Medicina y Jefe del Servicio de Alergia del Hospital Fundación Jiménez Díaz-IDC.

CERTIFICA:

Que **Doña Cristina Gámez Gámez**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado **“Estudio alergénico de la gamba *Solenocera melantho*: identificación de nuevos alérgenos y su implicación en la reactividad cruzada con el ácaro *Dermatofagoides pteronyssinus*”**,, y que una vez revisado, reúne todos los requisitos exigidos de calidad y originalidad para optar al grado de Doctora.

En Madrid, a 20 de Enero de 2014

Fdo. Dr. Joaquín Sastre Domínguez

*El éxito es la suma de pequeños esfuerzos
que se repiten cada día.*
Anónimo

A Mís Padres
A Daní

*EMPEZANDO POR LO PRINCIPAL...
LOS AGRADECIMIENTOS*

Ya estoy en frente de esta página, ¡¡la de los agradecimientos!! Eso quiere decir que hemos llegado al final de esta historia, la cual he escrito y vivido gracias a todos vosotros...

¿Por donde empezar? Pues creo que por el Dr. Carlos Lahoz, ¡te lo mereces!, porque desde el principio creíste en mi como científica y en mis posibilidades para hacer una tesis. Me acuerdo de nuestros primeros contactos, aunque al principio tímidos, poco a poco nos fuimos uniendo en Inmunal, donde estábamos tan solos en el mundo del I+D, ¿te acuerdas? Gracias Carlos por confiar en mi.

Y gracias a Carlos llegué al Labo 1 de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz, dirigido por la Dra. Victoria del Pozo, el primer día, y Vito para el resto de los días. También me acerqué por el departamento de Alergia, y aquí el Dr. Joaquín Sastre me brindó la oportunidad de trabajar con la gamba. Por lo tanto les estoy muy agradecida a ambos por haber dirigido la presente tesis doctoral.

La Dra. Victoria del Pozo, como directora de esta tesis doctoral, perdón, Vito, me acogió desde el primer momento con los brazos abiertos, y poco a poco fuimos adaptándonos la una a la otra... A Vito tengo que agradecerle la oportunidad que me dio de poder realizar esta tesis doctoral bajo su tutela. Los principios fueron duros con el *Senecio*... pero es que no es nada fácil clonar, ¿verdad? Pero al final, con su facilidad para ver el lado positivo de las cosas, su perseverancia y su apoyo para desarrollar las ideas propuestas, al final, al final tengo MI TESIS. Vito, gracias por todo.

Al olvidarme del *Senecio* me acerqué a la gamba, y así también al Dr. Joaquín Sastre. Joaquín siempre liadísimo, pero siempre respondiendo los mails a la hora que fuese, entre diario o en fin de semana; aportando sus ideas y un poco de equilibrio clínico en todo esto. Además, fue mi alergólogo particular, el cual confirmó mi sensibilización a las almejas realizando unos SPTs a conciencia. Joaquín, gracias por ser mi director de tesis y mi alergólogo.

Antes de seguir, quiero darle las gracias a todos los que por mi mala cabeza pueda olvidar mencionar aquí y crean que debería haberlo hecho. Gracias y espero sepan perdonarme.

Agradecimientos

Desde que llegué a la FJD a principios de Septiembre del 2007, recuerdo asomarme en el Labo 1 y preguntar por la Dra. Victoria del Pozo. Llegaron las primeras impresiones, Bea, ¿por que pensaste que era una comercial? A los 2 días de ese primer contacto ya tenía la bata blanca puesta. Durante los últimos 5 años en el Labo de la FJD a mi lado he tenido mucha gente con la que he compartido muchos momentos. Gracias a su apoyo, su cariño y amistad ha sido posible llegar hasta este punto ¡GRACIAS!

Al principio tuve a mi lado a Carmen, siempre trabajando y callando; a Esther, mi mami en el labo que me ayudó a adaptarme al nuevo ritmo, siempre recordaré nuestros momentos de la fruta. Y Bea, mi Bea, muchas gracias por estar ahí desde el principio, has hecho que todo esto sea mucho más fácil. Gracias por escuchar todas las tardes los rollos de clonaje que te soltaba para intentar solucionar, si no como clonar, al menos nuestro mundo. Gracias por dedicarle tu tiempo a mi tesis, y valorar el trabajo realizado. Espero que puedas estar a mi lado el día de la defensa para vivirlo y disfrutarlo juntas. Bea, desde esa primera vuelta que me diste por el hospital supe que siempre te seguiría, has sido un buen ejemplo dentro y fuera de este labo y estaré siguiéndote constantemente.

También al principio, aunque en la distancia, estaban Olga y Rocío, de quien heredé el dichoso *Senecio*... Gracias por apoyarme desde lejos y animarme a seguir.

Poco a poco el tiempo pasaba, y la gente de mi alrededor cambiaba... así llegó Eryca, la mejor técnico japo-patinadora-cocinera que se pueda tener. Ery, muchas gracias por ser como eres, por aprender con esa ilusión y por tu disponibilidad para echar una mano sin que se te pidiese. Quiero que sepas que seguiremos cocinando nuestra amistad aunque estemos lejos.

Y mis niñas, por ser las peques y de las últimas en llegar al labo, Vero y M^a Paz. ¡¡¡Maripi!!! siempre en tu mundo paralelo, pero cuando se te llamaba salías de él y aquí estabas a mi lado, muchas gracias por los momentos dentro y fuera. Gracias por tu optimismo, por la ilusión con la que arrancabas cada idea y transmitirme un poco de tu entusiasmo. Al final te ha tocado hasta revisar mi tesis ¡¡y eso que al principio no soltabas el mono con platillos cuando te hablaba de ella... lo entiendo, el clonaje estaba en otra dimensión!! Cuando quieras nos disfrazamos de gamba o eosinófilo con una caja de cartón.

Y La Vero, ay mi Vero... ¿recuerdas que llegaste para ayudarme con el clonaje? ¡Vaya sí me ayudaste, un montón! Pobrecilla, que marrón te dejé cuando me fui a Viena... Que a gusto nos quedamos las dos cuando llegó la gamba a nuestras vidas para darle una patada al polen del *Senecio* de los c... Me acuerdo del momento que tuvimos en la cámara fría comenzando, pero como lo solucionamos rápidamente en frío y no dejamos que se calentase... ¡Bastante teníamos con que calentarnos la cabeza fuera! Y desde entonces siempre has estado a mi lado y yo al tuyo, ayudándonos la una a la otra. Gracias por no ser

una simple técnico que sigue un protocolo, gracias por hacer pensar a esa neurona que tienes y que, para ser una sólo, la explotas muy bien.

Las últimas en llegar al labo fueron Ana y Carla, ambas con caracteres totalmente diferentes al mío, pero compañeras de faena. Carla, gracias por tus sesiones de Yoga para intentar transmitirme la paz que necesitaba en los últimos momentos de la tesis. *Om nama gana tapaye!!!*

Saliendo por la puerta llegué al Labo 2, y aquí me encontré con la Dra. Blanca Cardaba, o mi amiga Blanqui, gracias por esos momentos de tomar aire, por escucharme y aconsejarme. Al principio me acompañó Marina, juntas hicimos los cursos y trabajos de doctorado. Al poco llegó Miriam, con su humor negro, y aquí estamos ahora las dos al final de este recorrido. Ya estamos casi en la meta, pero que sepas que para mi no ha sido una competición, ha sido un empujón de la una a la otra para poder llegar al final. Y por allí pasó José, el sevillano mas desaborió que he “conocío”, pero un buen tío. Y los que quedan por el Labo 2, David y Selene, arrancándose con los blottings los dejé... Las PCRs me unieron un poco más a David, tanto que... ¡hasta hemos compartido habitación y lotería! Selene, aunque no he tenido mucho tiempo de interactuar contigo te deseo mucha suerte a lo largo de tus próximos años en la FJD y espero que los disfrutes como yo.

Mientras tanto en el pasillo me encontré con la Dra. Pilar Palomino, la Dra. Soledad Gallardo y la Dra. Rosa García; las 3 constantemente interesadas en mi trabajo y demostrándome siempre su cariño. Pili, gracias por darme tu *cum lauden* antes de tiempo.

Y al final del pasillo llegué al Labo 4, donde siempre que abría la puerta me encontraba una cara amable y dispuesta a prestarme cualquier cosa, no sólo reactivos... también su tiempo y su cariño.

Desde la primera vez que abrí la puerta estaban Carlitos y Aroa. Carlitos, gracias por ayudarme a conocer un poco más el mundo de las proteínas y su química. Aunque te di bastante la vara, se que en el fondo te encantaba, ¿o no? Y Aroa, siempre que entraba por la puerta ya sabía si venía a pedir algo o a hacer proposiciones... gracias por estar siempre lista para tomarse esas cañas. Y a tu Vero, también a la verita mía haciéndome reír en tantas ocasiones. Ya hace tiempo que salieron del labo pero no les puedo olvidar. Fernando, Bárbara y Marina, compañeros de faena, de cañas y mucho más. Fer, recuerdo perfectamente tu tesis en la que brillaste gracias a tu laser, y ahora sigues brillando, enhorabuena a ti e Irene por lo que viene este año. Marina y Bárbara, pescado o sandía, *Senecio* o gamba, que más da. Gracias por estar al fondo del pasillo y hacer que no me sintiese tan sola en el mundo de los alérgenos. Grande ha sido vuestra ayuda al principio y sobre todo al final. Marina, siempre recordaré nuestro congreso en Londres y el salmón noruego que nos

encontramos en el Thamesis. Y Gloria, la dulce Gloria, mi compañera de metro para ir arrancando el duro día a día. Gracias por apoyarme y regalarme tu sonrisa todos los días.

De repente, sin darme cuenta, Zubiri ya no era de nefro, y se hizo su hueco en el Labo 4 y como mi amiga. Co-conchita, compañera dentro y fuera, a la que podía encontrar a últimas horas con sus pises de aquí “pá yá”. Y por este labo terminé encontrándome a María, Marta y Laura. A la cuasi Dra. María Posada, gracias por esa exposición de fechas y papeles para realizar los trámites para llegar a serlo. Marta, con su voz de niña buena de no haber roto nunca un plato, en poco tiempo me di cuenta de lo que vales aquí, en Palencia o en Leidem, gracias por compartir conmigo tu tiempo y animarme. Y Laura, la peque que me costó ubicar en el Labo 4 porque siempre la veía por huesitos, gracias por tu su sonrisa de labios rojos.

Y al otro lado del pasillo, pasados los ascensores naranjas, no los rojos, me encontré a los amigos y compañeros de huesitos. La de veces que os di la plasta para hacer las fotos de mis geles de las PCRs, y mientras tanto cuantas charlas hemos compartido... Dani y Luis, ¡vaya par de dos! Dani, con tu encanto me camelaste y al final conseguiste lo que querías... ¡¡tú pastel!! Luis, sevillano con arte fotográfico; Sergio, gracias por tu experiencia; y Juanan, que fue como el Guadiana, estuvo, desapareció y volvió. Y las niñas huesitas; Adela, que sí, que ya llevo en Madrid 20 años, créetelo, fue un placer compartir bacterias y vivencias contigo; Martita, tan buena para compartir el nanodrop como unas cañas; y por último Anita, terminando este camino de penurias y alegrías juntas, gracias por tus abrazos cada vez entraba por la puerta.

Y entre los que andan más desperdigados, por abajo y por arriba, me encontré en el pasillo con Jess y Raúl. Dra. Jess Andrés, a puntito estuvimos de ser compañeras de poyata, pero aunque al final no compartimos la pipeta, hemos compartido muchos buenos momentos dentro y fuera que siempre recordaré; momentos en los cuales también estaba Raúl, gaditano con gracia, salero y don de gentes, siempre dispuesto a sacarte una sonrisa, ¡Olé que arte!

Y más cerca, pero en medio de todos estaban los compañeros de Nefro. Los mayores que me acogieron y aconsejaron al llegar a esta casa, los dos Oscar, el pequeño aconsejándome sobre enzimas de restricción y ahora sobre la vida en Liverpool; Oscar el alto, que se pensaba que me podía vacilar pero “pá” vacilona yo; Juan el cordobés, “il a été un plaisir travailler a ton coté”; y Beñat, animándome desde ese día en la playa de Madrid en la que no teníamos un cubo y pala para jugar con la arena pero si muchas ganas de clonar.

Mis coetáneos de Nefro; Sares, Conchi, Julio, Alberto, Álvaro; todos ya doctores y casi todos ya dispersos por el mapa geográfico de la ciencia, gracias por esa sonrisa en el pasillo (o Sares, no solo una sonrisa), esas cuatro palabras

de ánimo y gracias por ser el puente de unión con el resto de compañeros de Nefro. Conchi, tigresa de ricitos de oro, ¿cuando repetimos una cena?, me supo a poco. Y Belén, ahora lejos, pero siempre cercana y entusiasta. También estaba Sergio, tan bonachón, como un niño grande que también será Dr. en breve. Y entre los más frescos de Nefro, aunque tuve menos tiempo para conocerlos, pero suficiente para darme cuenta de la buena gente que sois, gracias a Cernes, Christian, Carlos y Alfonso, los cuatro grandes chicos, currantes, divertidos y especiales cada uno en su estilo. Alfon, pichi, de Baza, que cosas, quizás nos vimos en unas fiestas por Baza hace unos años, pero nos hemos encontrado aquí, y espero verte por Hinojares en el futuro.

Bajando en el ascensor y en la segunda planta me encontré con Laura del Puerto Nevado y Sandra, gracias por esas jornadas en Mallorca y por tantos otros momentos en vuestro chiringo de pneumo.

En esta misma planta quiero agradecer a toda los compañeros de genética que me acogieron desde el principio, los cuales me animaban y proponían ideas cada vez que me tocaba secuenciar.

Y bajando un piso más, llegué al servicio de Alergia. Gracias a todo las personas que me han echado una mano con los pacientes de la gamba, sobre todo a las enfermeras Ade y Marga. También a Manolo y Javier por compartir algún que otro café y sus historias sobre alergia o la vida de los alergólogos. Por interesarte en mi tesis, por aconsejarme que leer y que copiase bien... gracias Javier. Manoli, gracias por estar ahí abajo y fuera.

Quiero darle las gracias a los pacientes voluntarios que pasasteis por el servicio de alergia, y también pediros perdón porque aunque todavía no podéis comer gambas por Navidad, todo se andará... dadme tiempo.

Durante todos estos años varios residentes han pasado por el labo con intención de aprender, unos más que otros, como se trabaja en investigación. Entre estos no puedo olvidarme de los chic@s de Toledo en general, pero de Eva en especial. Eva, que sepas que aun está pendiente ir a ese chochódromo en Mora. Tampoco puedo olvidarme de María Pedrosa, ay... ande estará mi marido... me alegro de que al final lo encuentres. Siempre recordaré los momentos de las "ehspin columhs" y tus historias.. ¡¡ja mi también, a mi también!! Y Laura, la farmacéutica del máster, sólo fueron 6 meses juntas, pero espero que el día que esto acabe estés disfrutando el momento conmigo.

Y todos los residentes de la FJD, especialmente Luis, Lourdes, Mónica y Maru. Luis, no queríamos que tuvieses un trato especial... pero es que eres especial, no sólo como residente, si no como marido de... y como mi amigo. Gracias por transmitirme tus conocimientos sobre alergia y hacerme pasar tantas

Agradecimientos

tardes-noches buenas compartiendo juegos y risas. Lourdes y Mónica, ambas diferentes, pero con muchas cosas en común... espero seguir viéndonos en UK. Y Marucita, la dulce y despistada Maru con su príncipe Muesli, gracias por endulzarnos todos los días.

Bajando, bajando hasta el fondo de la FJD, quiero agradecer a Paloma por hacerme esos CAP rápidamente; a Raqueliya, Olaya y Cesar, por interesarse por mi trabajo y por como me iba la vida. Cesar, gracias también por ser mi primer conejillos de indias con mis extractos.

Y por la FJD independientes de los laboratorios, o formando parte de todos, me falta agradecer a las auxiliares, Flor, Isabel y Pili, porque ellas nos facilitaban mucho el trabajo. Gracias también por esos momentos de tomarnos la fruta en vuestro reino.

También quiero agradecer a la Conchita por concederme la beca durante mis primeros años y sobre todo por la oportunidad que me brindó para poder realizar mi estancia en Viena.

Los meses que estuve en Viena fueron unos de los mejores dentro de mi vida científica. Durante estos meses descubrí otra forma de trabajar, además de como se valoraban mis cualidades y mi trabajo, ofreciéndome la posibilidad de quedarme, pero no pudo ser porque yo tenía algo pendiente en España, terminar una tesis.

Professor Valenta, I will always be grateful for the opportunity that you brought to me. I always saw you as a popper scientific in the world of allergens, so when I wrote to you the first mail, I didn't hope your quick answer! Thank you for accepting me in your team.

Birgit, my direct supervisor in Wien's laboratory; you were not only my supervisor; you were my friend, my mummy, my teacher and my paellas' fan. I know that following my paellas' protocol; you already make better paella than me. Thank you to make me feel so valuable.

And thank you to all my collage of the lab there, especially Clarissa, Daniella, Milena, Verina, Eva and Meena. I always remember all the moment we spent together, and how you make me cry with the Mona Lisa Smile.

Al empezar en el mundo de la alergia, lo hice con Virgi, ¡vaya madrugones para ir juntas a Diater hasta San Martín de la Vega! Luego me abandonaste, pero yo te seguí hasta Inmunal, y aquí nos encontramos con Marta, vaya grupo Las Perys. Que buenos y malos momentos nos hizo pasar Ameneiro. En Inmunal entré con Carlos, saliste antes que yo, pero menos mal que al final todos terminábamos saliendo... y apareció Elsa. Cuantas horas en la sala estéril

aisladas del mundo, solas las dos, y pensando cual de las dos estaba más loca... y Carlos volvió acercándose a las dos.

Dra. Alicia Grau y Dra. Rosa Rodríguez, gracias por transmitirme vuestra experiencia en la empresa privada, por hacerme un poco más pícara entre los peces gordos, y sobre todo por apoyarme cuando estando a vuestro lado me dieron una de las peores noticias de mi vida.

Y ahora terminando con la tesis, he encontrado un gran apoyo en mis horas de zapateo. Gracias Sara y Laura por hacerme olvidar todo un rato y por animarme a zapatear más fuerte. Laura, gracias por hacerme sentir 27 años otra vez, y gracias al azar que hizo que nos encontrásemos en el aeropuerto camino de Marsella para descubrir todo lo que teníamos en común.

En mi época de estudiante universitaria nunca pensé que me dedicaría a la alergia, la inmunología, aunque obtuve un notable, nunca fue mi fuerte... Pero gracias a mis compañeras de la facultad todo era mucho mas fácil en esos tiempos. Recuerdo el primer día que me encontré con Carol en la cola para hacer la matrícula, y desde entonces somos amigas. Luego nos unimos Sandra, Noelia y Maki; cuantas horas juntas en las aulas, en la biblioteca, en las practicas, en la cafetería, en el césped, en el tren... y pasados unos años nos dimos cuenta de que había mas gente con la que siempre contar como Naira, M^a Ángeles, Noelia, Bea, David y el francés... con los que seguir compartiendo todos esos momentos. Entre todos estos, algunos os quedasteis en el camino, pero a la mayoría os sigo teniendo cerca y se que os tendré a mi lado para siempre. Chicas lo hicisteis muy bien antes y ahora seguís haciéndolo genial. Gracias también por haberme acercado a vuestros chicos, Nacho, Jose, Andrés, Pablo y David, ahora también mis amigos. Gracias chicas y chicos por compartir conmigo vuestros objetivos y logros. ¡¡¡Viva el babyboom!!!

Retrocediendo en el tiempo llego a mis amigas de siempre y las de para toda la vida. Patri e Irene, amigas desde que llegué a Madrid con 10 años y hasta ahora... Cuantas cosas vividas, cuantos momentos, lo que hemos reído y llorado juntas. Gracias por estar siempre ahí. Irene, aunque en el ultimo año te has alejado, sabes que siempre te querré porque no lo puedo remediar; y espero que el nuevo año nos acerque, aunque estemos en la distancia. Y mí Patri, creo que sabes lo importante que eres en mi vida, y por si no lo sabes, lo dejo plasmado aquí para que nunca lo olvides. Nuria, no desde los 10 años, pero ya si que son más de 10 años; o Elena, casi 10 los que te tengo a mi lado, siempre haciendo que todo sea mucho más fácil. Nuria, empezamos compartiendo un calimocho con mora y ahora comparto hasta tu casa. Siempre estaré a tu lado para lo bueno y para lo malo. Elenita y sus proposiciones... sabes que me tienes ganada y que cuando digas, ahí me tienes. Gracias por animarte a ese viaje a Canadá en el que descubrí que tendría una amiga con la que viajar toda mi vida. Y Cristina, la

Agradecimientos

rubita, la amiga “Panten” a la que nadie puede superar con su humor sarcástico, dispuesta a salir en cualquier momento, siempre y cuando no sea el día de lavarse el pelo, claro. Gracias chicas por acompañarme todos estos años y aceptarme tal y como soy, con mis virtudes y defectos.

En este punto no me puedo olvidar de los chicos, Raúl y Andrés, compañeros sentimentales con los que he contado siempre que lo necesitaba, compartiendo viajes, charlas, comilonas, cervezas... y con los que seguiré compartiendo mucho más. Raúl, gracias por darme siempre que te lo pedía tu opinión crítica-constructiva... ¿madre de chicho terremoto con varicela? Gracias por formar parte de mi familia de amigos.

Antes de centrarme en la familia, quiero recordar aquí a Rodolfo y Elena, que desde que entré en su casa para hacer los deberes con 10 años siempre se han preocupado por mi, casi como una hija más.

A mi familia francesa, gracias por acogerme y tratarme como una más desde el primer ¡“Bonn jooourrrr”!

Aux parents de Daniel, Chantal et Jean Louis, merci pour votre accueil depuis que je suis arrivais dans votre maison et me faire sentir comme votre fille. Je serais toujours votre petite et penserai a vous dans mon petite village et partout. Je vous promette que je m’occuperai bien de Daniel. Marc, Emanuel est ses femmes, merci pour me faire sentir une de plus dans la famille. Brice et Emilie, on a vécu plein chose ensembles, des heureux et tristes moments, des sorties de nuit á Madrid, des jours chaleureux en Andalousie en arrivant dans mon petite village. Brice, j’espère te voir dans la défense de ma thèses pour le fêter ensemble. Et merci a tous les cousins et cousines, qui fussent mes coussins et cuisines au début. En spécial je voudrais remercier à Pascal et Caro pour vous sentir aussi prés depuis le premier moment que on s’a vu.

Ya me acerco al final, a mi familia de sangre, como Daniel decía, esos andaluces de Jaén. A mis abuelos, especialmente a Tiscar y José, por ocuparse de mi y mi hermano cuando mis padres estaban lejos. A mi hermano, que aunque no me llame, ni nos veamos a menudo se que puedo contar con él para lo que sea, y él sabe que a aquí estoy para lo que él quiera. Gracias por darme la mejor sobrina del mundo. Celia, llevas poquito con nosotros y aunque ahora no lo sepas, ya te darás cuenta como con tan sólo tu presencia cambias mi día y sobre todo el de tus abuelos.

No puedo olvidarme de mis ti@s y prim@s, los cuales, dadas las circunstancias, he tenido más cerca o más lejos. Gracias a todos ellos, en especial a mi tía Nieves por enseñarme a leer la cartilla Paláu; y seguir apoyándome a lo largo de mi vida y empujándome a estudiar. Yo intentaré hacer lo mismo con Alejandro, a ver si le ponemos en vereda. Alejandro, sabes que no te voy a dejar tranquilo. A mi tía Pura; ¡tita!, como me gustaba que llegasen las vacaciones de

verano para irme al pueblo contigo. Yo era como su niña, pero no, faltaba por llegar la verdadera niña, Elena Tiscar. Elena niña, que ya es una mujer hecha y derecha, sigue como hasta ahora con ese carácter especial que todo lo que se propone lo consigue, no cambies nunca. Cuando queráis hacemos otros chorizos todos juntos.

Tocando lo más profundo de mi familia, llego a mis padres, gracias madre y padre por criarme, educarme y hacerme la persona que soy. Al principio no os tuve cerca todo lo que a un niño le hubiese gustado tener a sus padres, pero las circunstancias nos separaron, y ahora las circunstancias hacen que no podáis estar con vuestra hija. Soy yo la que ahora tiene que irse. Gracias por apoyarme en todo lo que he emprendido en esta vida, espero que os sintáis tan orgullosos de mi como yo lo estoy de vosotros por ser unos padres excepcionales. Papa, esta mañana te levantaste y el abrazo que me diste me reconfortó para seguir empujando las teclas hoy y durante mucho tiempo más. Y Mama, Madre, Tiscar, no tengo palabras para darte las gracias por todas las horas dedicadas, tu apoyo y todo tu amor. Espero poder devolveros todo lo que me habéis dado llenando vuestra vida de alegrías y satisfacciones.

Padres, que me aleje de vosotros sabéis quien tiene en parte algo de culpa... mi Dani. Ese francesito que no paraba de mirarme en clase porque, ilusa de mi, me pensaba que lo tenía en el bote, pero realmente me miraba porque... ¡no me callaba! Hace poco celebramos, aunque separados, los 12 años que llevamos acompañándonos el uno al otro. Desde que entraste en mi vida todo empezó a ir mejor... mis notas mejoraron al hacerme una rata de biblioteca para pasar más tiempo contigo, aprendí francés y conocí el verdadero amor. Dani, aunque yo solita me decidí a arrancar esta aventura de la tesis, creo que en parte lo hice pensando que así sería mas fácil seguirte allá donde vayas. Constantemente me has apoyado, escuchado pacientemente y soportado mis cambios de humor inexplicables sobre todo en la última fase de esta etapa. Estoy deseando empezar otra pagina más en blanco contigo, y seguir escribiendo nuestra historia juntos.

Daniello, ¡TE QUIERO, JE T'AIME, I LOVE YOU!

Lo dicho, gracias a todos por ayudarme a lo largo de estos años, por estar a mi lado y aceptarme tal y como soy.

A TODOS... GRACIAS!

ÍNDICE

| | |
|----------------|----------|
| <i>SUMMARY</i> | i |
|----------------|----------|

| | |
|----------------|------------|
| <i>RESUMEN</i> | vii |
|----------------|------------|

| | |
|---------------------------|-------------|
| <i>LISTA ABREVIATURAS</i> | xiii |
|---------------------------|-------------|

| | |
|-------------------------------|-------------|
| <i>LISTA FIGURAS Y TABLAS</i> | xvii |
|-------------------------------|-------------|

| | |
|---------------------|----------|
| <i>INTRODUCCIÓN</i> | 1 |
|---------------------|----------|

| | |
|--|-----------|
| 1. Alergia | 3 |
| 1.1. Conceptos y generalidades | 3 |
| 1.2. La reacción alérgica | 4 |
| 2. Alergia a alimentos | 5 |
| 2.1. Reacciones adversas a los alimentos: concepción y clasificación | 5 |
| 2.2. Alergia a alimentos mediada por IgE | 7 |
| 2.3. Mecanismo inmunológico de la alergia a alimentos | 9 |
| 2.3.1. Mucosa intestinal: transporte y sensibilización | 9 |
| 2.3.2. Balance Th1/Th2 y células T reguladoras | 11 |
| 2.4. Manifestaciones clínicas de la alergia a alimentos | 13 |
| 2.4.1. Manifestaciones cutáneas | 13 |
| 2.4.2. Reacciones gastrointestinales inmediatas | 14 |
| 2.4.3. Manifestaciones respiratorias de la alergia a los alimentos | 14 |
| 2.4.4. Anafilaxia inducida por alergia a alimentos | 14 |
| 2.5. Diagnóstico de la alergia a alimentos | 15 |
| 2.6. Tratamiento de la alergia a alimentos | 17 |
| 2.6.1. Nuevos avances en el tratamiento de la alergia a alimento | 18 |
| 2.6.1.1. Terapias específicas de alérgeno | 18 |
| 2.6.1.2. Terapias no específicas de alérgeno | 19 |
| 3. Alérgenos | 20 |
| 3.1. Definición y características generales | 20 |
| 3.2. Nomenclatura y clasificación | 22 |
| 4. Reactividad cruzada | 23 |
| 5. Alergia al marisco | 24 |
| 5.1. Definición y clasificación del marisco | 24 |
| 5.2. Prevalencia e incidencia de la alergia al marisco | 25 |
| 5.3. Alérgenos del marisco | 26 |
| 5.4. Tropomiosina como panalérgeno | 29 |

| | |
|------------------|-----------|
| <i>OBJETIVOS</i> | 31 |
|------------------|-----------|

| | |
|-----------------------------|-----------|
| <i>MATERIALES Y MÉTODOS</i> | 35 |
|-----------------------------|-----------|

| | |
|--|-----------|
| 1. Sujetos de estudio | 37 |
| 2. Obtención de muestras | 37 |
| 3. Pruebas cutáneas | 38 |
| 4. Determinación de la IgE específica | 38 |
| 5. Provocación oral doble ciego controlada con placebo | 39 |
| 6. Obtención de los extractos proteicos de la gamba <i>Solenocera melanthero</i>: crudo, cocido y líquido de cocción | 40 |
| 7. Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE | 40 |
| 7.1. Tinción azul coomassie coloidal | 41 |
| 7.2. Electrotransferencia | 41 |
| 8. Inmunodetección | 42 |
| 8.1. Inmunodetección de proteínas separadas por SDS-PAGE | 42 |
| 8.2. Inmunodetección de proteínas mediante <i>dot-blot</i> | 43 |
| 9. Identificación de nuevas proteínas alergénicas de la gamba <i>Solenocera melanthero</i> | 43 |
| 9.1. Espectrometría de masas | 43 |
| 9.2. Inmunodetección de las nuevas proteínas | 44 |
| 10. Ensayos de inhibición de la inmunodetección | 44 |
| 11. Purificación de la tropomiosina del extracto de la gamba <i>Solenocera melanthero</i> | 45 |
| 11.1. Obtención del extracto de proteínas miofibrilares de la gamba <i>Solenocera melanthero</i> | 45 |
| 11.2. Precipitación isoeléctrica | 46 |
| 11.3. Precipitación con sulfato amónico | 46 |
| 12. Digestión gástrica <i>in vitro</i> de los extractos y la tropomiosina purificada de la gamba <i>Solenocera melanthero</i> | 46 |
| 13. Obtención de sueros de conejo anti-gamba cocida y anti-gamba cocida digerida | 47 |
| 14. Enzimoimmunoensayo (ELISA) | 48 |
| 14.1. ELISA de titulación de los anticuerpos de los sueros de los conejos | 49 |
| 14.2. ELISA de inhibición | 49 |
| 14.3. ELISA de competición | 50 |
| 15. Test de activación de basófilos | 51 |
| 16. Purificación de células mononucleares de sangre periférica | 52 |
| 17. Ensayos de proliferación de linfocitos T | 53 |
| 18. Análisis estadístico | 54 |

RESULTADOS **55**

| | |
|--|-----------|
| 1. Población de estudio | 57 |
| 1.1. Características demográficas y sintomatología de los sujetos de estudio | 57 |
| 1.1.1. Población procedente de zona con clima continental y seco (Madrid) | 57 |
| 1.1.2. Población procedente de zona con clima costero y húmedo (Lugo) | 60 |
| 1.2. Características clínicas de los sujetos de estudio | 62 |
| 1.2.1. Provocaciones orales doble ciego controladas con placebo | 62 |
| 1.2.2. Pruebas cutáneas | 64 |
| 1.2.3. IgE específica frente a gamba, ácaro y rPen a 1 | 65 |
| 2. Caracterización de una nueva fuente alergénica | 67 |
| 2.1. Obtención del extracto proteico de la gamba <i>Solenocera melanthero</i> | 67 |
| 2.2. Estudio del perfil proteico del extracto de la gamba <i>Solenocera melanthero</i> | 68 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3. Estudio del perfil alergénico de las proteínas del extracto de la gamba <i>Solenocera melantho</i> | 68 |
| 2.4. Identificación de proteínas del extracto de gamba <i>Solenocera melantho</i> mediante espectrometría de masas | 71 |
| 2.4.1. Comprobación de que las proteínas identificadas están presentes en la gamba <i>Solenocera melantho</i> | 72 |
| 2.4.2. Confirmación de las proteínas identificadas como nuevos alérgenos de la gamba <i>Solenocera melantho</i> | 74 |
| 2.5. Purificación de la tropomiosina de la gamba <i>Solenocera melantho</i> | 75 |
| 3. Estudio comparativo de la reactividad de los extractos de gamba y ácaro en dos poblaciones diferentes: clima continental seco (Madrid) y clima costero húmedo (Lugo) | 76 |
| 3.1. Perfil alergénico de las poblaciones de estudio frente al extracto de la gamba <i>Solenocera melantho</i> | 76 |
| 3.2. Perfil alergénico de las poblaciones de estudio frente al extracto del ácaro <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> | 78 |
| 3.3. Relevancia de las proteínas identificadas en la gamba <i>Solenocera melantho</i> en la alergia a marisco y ácaro en ambas poblaciones | 81 |
| 3.4. Relevancia de las proteínas identificadas en la gamba <i>Solenocera melantho</i> en la reactividad cruzada entre gamba y ácaros | 84 |
| 4. Estudio de la reactividad cruzada | 85 |
| 4.1. Reactividad cruzada entre la tropomiosina de gamba y ácaro | 85 |
| 4.2. Reactividad cruzada entre los extractos de gamba y ácaro | 87 |
| 5. Aproximaciones experimentales para el desarrollo de un extracto hipoalergénico de gamba | 92 |
| 5.1. Estudio de las proteínas del extracto de gamba mediante tratamiento térmico | 92 |
| 5.1.1. Perfil proteico de los extractos de gamba crudo, cocido y líquido de cocción | 92 |
| 5.1.2. Reactividad IgE de los extractos tratados con calor y del extracto crudo de gamba | 93 |
| 5.2. Estudio de la susceptibilidad de los alérgenos del extracto de gamba a la digestión con pepsina | 94 |
| 5.2.1. Digestión <i>in vitro</i> con pepsina de los extractos de gamba crudo y cocido | 95 |
| 5.2.1.1. Análisis del perfil proteico de los extractos de gamba digeridos con pepsina | 95 |
| 5.2.1.2. Análisis de la reactividad IgE de las proteínas de los extractos de gamba digeridos con pepsina | 96 |
| 5.2.2. Digestión <i>in vitro</i> con pepsina de la tropomiosina purificada de <i>Solenocera melantho</i> | 97 |
| 5.2.2.1. Análisis del perfil proteico de la tropomiosina purificada digerida y sin digerir | 97 |
| 5.2.2.2. Análisis de la reactividad IgE de la tropomiosina purificada digerida y sin digerir | 98 |
| 5.2.3. Digestibilidad y reactividad IgE de las proteínas del extracto de gamba <i>Solenocera melantho</i> y de su tropomiosina purificada, modificando el pH de la digestión | 100 |

| | |
|---|------------|
| 5.2.3.1 Digestibilidad y reactividad IgE de las proteínas del extracto completo de gamba modificando el pH de 1,2 a 3,0 | 100 |
| 5.2.3.2. Digestibilidad y reactividad IgE de la tropomiosina purificada modificando el pH de 1,2 a 3,0 | 101 |
| 6. Estudio del extracto cocido y digerido de gamba como extracto hipoalergénico | 103 |
| 6.1. Reactividad IgE | 103 |
| 6.2. Alergenicidad del extracto cocido y digerido de gamba | 104 |
| 6.2.1. Pruebas cutáneas con diferentes extractos de gamba | 104 |
| 6.2.2. Test de activación de basófilos | 106 |
| 6.3. Capacidad inmunogénica del extracto cocido y digerido de gamba | 108 |
| 6.3.1. Proliferación de linfocitos T | 108 |
| 6.3.2. Producción de anticuerpos IgG con capacidad bloqueante | 109 |
| 6.3.2.1. Producción de anticuerpos IgG en conejos | 109 |
| 6.3.2.2. Capacidad bloqueante de los anticuerpos IgG de los sueros de los conejos | 109 |
| DISCUSIÓN | 111 |
| 1. Alergia al marisco | 114 |
| 1.1. Prevalencia y características demográficas | 114 |
| 1.2. Características clínicas de la alergia al marisco | 115 |
| 2. Pruebas diagnósticas | 117 |
| 3. Caracterización de los alérgenos de la gamba <i>Solenocera melanthero</i> | 119 |
| 3.1. Identificación de los alérgenos de la gamba <i>Solenocera melanthero</i> | 120 |
| 4. Estudio de la reactividad cruzada | 125 |
| 4.1 Estudio comparativo del alergograma de dos poblaciones diferentes frente a los extractos de gamba y ácaro | 125 |
| 4.2. Proteínas implicadas en la reactividad cruzada entre la gamba y el ácaro | 128 |
| 5. Aproximaciones para la obtención de un extracto de gamba hipoalergénico | 130 |
| 5.1 Tratamiento del extracto de gamba mediante calor | 130 |
| 5.2. Tratamiento del extracto de gamba mediante digestión gástrica | 131 |
| 6. Estudio del extracto cocido y digerido de gamba como extracto hipoalergénico | 133 |
| 6.1. Disminución de la alergenidad del extracto de gamba hipoalergénico | 133 |
| 6.2. Retención de la capacidad inmunogénica | 134 |
| CONCLUSIONES | 137 |
| BIBLIOGRAFÍA | 141 |
| ANEXOS | 157 |
| ANEXO I: Secuencias proteicas de los alérgenos identificados en la gamba <i>Solenocera melanthero</i> | 159 |
| ANEXO II: PUBLICACIONES | 163 |
| ANEXO III: CURRICULUM VITAE | 175 |

SUMMARY

INTRODUCTION

Seafood, particularly shrimp, is a widely consumed food product. Over the past decades, shrimp consumption has increased in many countries. As shrimp has become a popular food, the numbers of allergic reactions reports in consumers and in seafood processors have increased the last decade. It may induce mild to severe allergic reactions and usually persists throughout life. In spite of the high prevalence of shellfish allergy, few options are available for treatment, and avoidance of the offending food is the only recommended therapy.

Tropomyosin (TM) was the first shrimp allergen, which has been detected and identified as major allergen responsible for ingestion-related allergic reactions, and its cross reactivity (CR) has been well-defined in invertebrates. In recent years, several other shrimp allergens have been described, including arginine kinase (AK), sarcoplasmic calcium-binding protein (SCBP), myosin light chain, troponin C and triose-phosphate isomerase; although little is known about the clinical relevance of these allergens and their role in CR.

CR is frequent among species of shellfish group, but CR among shellfish and other invertebrates is common too. Shrimp-allergic patients have also reported reactions to mites, and clinically relevant CR between crustaceans and house dust mites (HDM) allergens has been extensively studied. It is well known that HDM are implicated in detectable immunoglobulin E (IgE) to shrimp, even in individuals not exposed to shrimp. To date, around 23 HDM allergens have been described, and it seems that the IgE frequency of individual allergens may vary considerably, at least in certain populations, so other allergens are probably implicated in clinically relevant mite-seafood CR. In fact, it was recently hypothesized that a 20-kDa allergen and other high molecular weight (MW) shrimp allergens could be implicated in mite-shrimp CR. Normally, the primary sensitization is mostly due to HDM allergies, which then

sometimes cause allergic reactions to shrimp in some individuals. However, allergy to HDM can also occur after sensitization to crustaceans. These differences could be based on the origin, diet, and environment of the populations that have been studied.

Although the mechanisms by which individuals become sensitized to food allergens are unclear, most food allergen sensitization may occur via the gastrointestinal tract. Several studies report that TM is an extremely stable protein that retains and, even, increases its allergenic activity after heat treatment. However, the stability and allergenicity variation of TM and other shrimp proteins after simulated gastric fluid treatment are not well known.

OBJECTIVES

The aim of the present study was to identify new shrimp allergens from *Solenocera melanthero* implicated in seafood allergy, and their role in mite-seafood CR.

Furthermore, this study focuses on the development of a hypoallergenic shrimp extract in order to improve the currently shrimp and seafood allergies.

MATERIALS AND METHODS

A total of 45 patients were recruited from a city with continental dry-climate (Madrid). Thirty-six had a history of immediate symptoms suggestive of shrimp allergy following ingestion of shrimp; 18 were sensitized to HDM too. Nine patients sensitized to HDM who tolerate shrimp were included. Shrimp allergy was assessed by performing a double-blind placebo-controlled food challenges (DBPCFC).

Twenty-four patients living in a city with a humid-climate (Lugo) presented symptoms after shrimp ingestion; 20 of which were also sensitized to HDM. Additionally, 5 patients mono-sensitized to HDM were included.

Sera from all patients were obtained and used for specific IgE quantification and/or IgE immunoblotting. Different sera pools from both climate populations were used for inhibition assays. A sera pool from 3 non-atopic volunteers was used as a negative control.

Peeled frozen shrimps (*S. melanthero*) were used to obtain soluble protein extract, and *D. pteronyssinus* extract (mite extract) was provided by a commercial laboratory.

S. melantho shrimp extract (shrimp extract) and mite extract were separated by SDS-PAGE under reducing conditions. Protein bands were detected with colloidal Coomassie blue. For immunodetection of IgE-binding proteins, the separated proteins were electroblotted onto a nitrocellulose membrane and incubated with individual sera or different sera pools.

Identification of proteins by mass spectrometry (MS) was performed. Those proteins that were unidentifiable by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-mass spectrometry were identified by *de novo* sequencing analysis (MS-MS). In order to corroborate that identified proteins could be allergens of *S. melantho* shrimp, dot-blot assays were performed using purified commercial proteins from different sources.

To study cross reactivity, immunoblot inhibition experiments were carried out with a sera pool from shrimp-allergic patients from continental dry- and humid-climate populations, using shrimp and/or mite extracts as solid-phase. Mite-seafood cross reactivity due to TM was confirmed by inhibition experiments.

Effect of heat treatment in IgE-reactivity of shrimp proteins was study by immunoblotting experiments with shrimp extracts: raw, boiled and its broth.

Furthermore, digestibility of purified TM and shrimp extract proteins in simulated gastric fluid was studied. IgE-reactivity of digested shrimp extract was analysed by immunoblotting.

Digested boiled shrimp extract was investigated as hypoallergenic extract by *in vivo* (skin prick test, SPT) and *ex vivo* (Basophils Activation Test, BAT) assays.

Immunogenic properties of hypoallergenic shrimp extract were demonstrated by T cells proliferation experiments and its ability to produce blocking IgG antibodies.

RESULTS

According to the clinical symptoms, patients were classified into 3 groups: mite-seafood sensitized patients (MSP), patients sensitized only to seafood (SP), and mite sensitized patients (MP). A total of 45 patients were selected from the population residing in the continental dry-climate: 18 belonged to the MSP group; 18 to the SP

group; and 9 to the MP group. Twenty patients living in the humid-climate were included in the MSP group, 4 in the SP group, and 5 in the MP group.

Furthermore, patients from the dry-climate who exhibited symptoms to mite-seafood or only to seafood were classified according to DBPCFC results as either shrimp allergic patients (SAP) or shrimp-tolerant patients (STP).

Allergic profile of shrimp *S. melanthero* shows several proteins that were detected by more than 50% of patients. Some of the most frequently recognized protein bands from shrimp extract were selected and analysed by MS. α -actinin (94-99 kDa), β -actin (46 kDa), fructose biphosphate aldolase (FBPA) (43 kDa), AK (41 kDa), TM (36-39 kDa), SCBP (17-24 kDa) and ubiquitin (5-7 kDa) were identified by MALDI analysis. Also, a mite extract protein band around 5-7 kDa was analysed by MALDI, and identified as ubiquitin. In order to provide additional proof that the identified proteins are present in shrimp extract and could be new allergens involved in shrimp allergy, IgE dot-blot assays were performed. The pool sera of shrimp-allergic patients are able to recognize purified commercial α -actinin, β -actin, and fructose biphosphate aldolase from different sources; however, ubiquitin was not detected.

To study the relevance of the identified allergens in mite-shrimp CR in the studied populations, the recognition frequencies of these proteins from MSP groups were compared. This comparison revealed that for the continental dry-climate population, α -actinin, β -actin, FBPA, TM, and SCBP were the most relevant allergenic proteins of shrimp. On the other hand, ubiquitin was a relevant allergen for the humid-climate population. When the same comparison was performed, but in this case among the recognition percentages of mite extract proteins with similar MW to those identified as new allergens in shrimp *S. melanthero*, the most relevant proteins were TM and α -actinin for continental dry-climate population, and ubiquitin for humid-climate population.

All these data indicate that the newly identified shrimp allergens, ubiquitin and α -actinin, could be partly responsible for mite-shrimp CR. In order to confirm that these proteins were involved in *S. melanthero* shrimp and *D. pteronyssinus* mite CR; and to distinguish the cause of primary sensitization, reciprocal immunoblot inhibition studies were performed. A strong inhibition of IgE binding to α -actinin and ubiquitin from

continental dry-climate population pool sera was obtained. In the other hand, inhibition of shrimp extract IgE-binding proteins was completed when sera pool from the humid-climate was pre-incubated with mite extract; nevertheless, when the inhibitor was the mite extract, partial inhibition was reached with 41 kDa protein. All these results suggest that in this continental dry-climate population, shrimp was the primary sensitizing allergen; by contrast, mite was observed to be the primary sensitizer in the humid-climate population of this study.

Between the approximations performed to obtain a hypoallergenic shrimp extract, heat treatment showed the same IgE-reactivity as raw shrimp extract. By contrast, *in vitro* digestion with pepsin of shrimp extract and purified TM produced lower IgE binding-capacity, as shown by immunoblotting.

The allergenicity of digested shrimp extract was compared with undigested shrimp extract by *ex vivo* and *in vivo* tests. The *in vivo* allergenic activity was studied by SPTs; wheals areas obtained with digested shrimp extract were significantly smaller than those obtained with undigested shrimp extract. Also, allergenic activity of undigested and digested shrimp extracts were analysed by BAT. When basophils from shrimp sensitized patients were incubated with digested shrimp extract, the percentage of activated basophil population was reduced significantly in comparison with undigested shrimp extract.

T cell proliferation assays with both shrimp extracts, digested and undigested, demonstrated that digested shrimp extract preserved T cell epitopes. Furthermore, this extract is able to induce IgG antibodies in sera from rabbits immunized with this extract, which were able to inhibit patients' IgE binding to shrimp proteins.

CONCLUSIONS

Crustaceans, particularly shrimps, are highly allergenic foods. Despite its high prevalence, knowledge of the allergen profile of crustaceans is still limited. To date, several shrimp allergens have been characterized, but no new shrimp allergens has been reported to be responsible of mite-seafood CR.

In the present study, seven proteins from *S. melanthero* have been identified, four of which, α -actinin, β -actin, fructose biphosphate aldolase and ubiquitin, could be novel crustacean allergens.

Moreover, this work has proved that ubiquitin, α -actinin, and arginine kinase shrimp allergens are responsible for mite-seafood CR.

These findings help to explain the high CR between mites and shrimp, and constitute a new step toward better diagnostic and therapeutic approaches to shrimp allergy.

Immunotherapy of food allergies is not the common course of treatment nowadays, because potent allergenic food tends to induce several adverse reactions, so is necessary to develop an effective and safe treatment for these allergies.

In this work, it has been shown that purified TM and shrimp extract do not retain their IgE-binding capacity after gastrointestinal digestion. The present study also has demonstrated a reduction of digested shrimp extract allergenicity, by *in vivo* and *ex vivo* experiments.

Furthermore, it was verified that this extract preserves the T-cell epitopes of shrimp proteins and it is able to produce IgG antibodies that inhibit the binding of allergic patients' IgE to shrimp proteins. Building on this observation, digestion treatment could be a good method to reduce shrimp allergenicity in order to obtain a safe and effective vaccine for shrimp allergy.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El marisco, particularmente la gamba, es uno de los alimentos cuyo consumo ha ido aumentando durante las últimas décadas, y con ello también lo han hecho el número de casos de reacciones alérgicas, tanto en consumidores, como en procesadores de marisco.

La alergia a marisco se caracteriza por producir reacciones de intensidad media a severa, las cuales suelen persistir a lo largo de la vida.

A pesar de la elevada prevalencia de la alergia a marisco, el único tratamiento efectivo es evitar la ingestión del alimento causante de dicha alergia.

El primer alérgeno descrito en la gamba fue la tropomiosina (TM), el cual ha sido detectado e identificado como el alérgeno mayoritario responsable de las reacciones alérgicas por ingestión de gambas. Además, la TM es el alérgeno responsable de la reactividad cruzada (RC) entre invertebrados.

En los últimos años, se han descrito otros alérgenos de la gamba, tales como las proteínas: arginin kinasa (AK), proteína sarcoplásmica de unión de calcio (SCBP), cadena ligera de la miosina, troponina C y la triosa fosfato isomerasa. A pesar de aumentar el panel de alérgenos de crustáceos, no existen estudios en los cuales se demuestre la relevancia clínica de estos alérgenos y su papel en la RC con los ácaros.

La RC es frecuente entre diferentes especies de marisco, pero también lo es entre otros invertebrados. Así, es común que pacientes alérgicos a gamba también presenten reacciones con ácaros, y es por eso que la relevancia clínica de sus alérgenos en la RC entre crustáceos y ácaros se ha estudiado extensamente. Hasta la fecha, se han descrito alrededor de 23 alérgenos en los ácaros, cuya frecuencia de reconocimiento varía considerablemente, al menos en ciertas poblaciones, así que otros alérgenos podrían estar implicados en la RC entre el marisco y los ácaros. De hecho, recientemente se han propuesto como proteínas de la gamba implicadas en la RC con el ácaro una proteína de alrededor de 20 kDa y otras de elevado peso molecular (PM). En la RC la primera

sensibilización, normalmente, es debida a las alergias a los ácaros, las cuales causan después reacciones alérgicas a gamba en algunos individuos. Sin embargo, la alergia a ácaros también puede deberse a una previa sensibilización a crustáceos. Estas diferencias pueden deberse al origen, dieta y ambiente de la población estudiada.

A pesar de que el mecanismo por el cual los individuos se sensibilizan a los alérgenos de los alimentos no se conoce, la mayoría de las sensibilizaciones por alérgenos alimentarios ocurren por la vía del tracto gastrointestinal.

Existen numerosos trabajos en los que se demuestra que la TM es estable, e incluso que aumenta su capacidad alérgica, cuando se trata con calor. Sin embargo, la estabilidad y alergenidad de la TM y otras proteínas de la gamba cuando ésta se somete a la digestión gástrica no se conoce bien.

OBJETIVOS

En el presente estudio se pretende identificar nuevos alérgenos de la gamba *Solenocera melanthera* implicados en la alergia al marisco, y estudiar su posible implicación en la RC con el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Además, se quiere obtener un extracto de gamba hipoalergénico que pueda ser empleado como tratamiento para la alergia a la gamba, en particular, y al marisco, en general.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se reclutaron 45 pacientes de una ciudad con clima continental seco (Madrid), 36 de los cuales tenían una historia clínica con síntomas sugestivos de alergia a gamba tras la ingesta de las mismas; entre estos sujetos 18 estaban sensibilizados también a los ácaros. Además se incluyeron 9 pacientes sensibilizados a los ácaros pero que toleraban la gamba. La alergia a gamba de los sujetos de esta población se confirmó mediante la prueba de provocación oral doble ciego controlada con placebo (PODCCP).

Además se reclutaron 24 pacientes de una ciudad con clima costero y húmedo (Lugo), que presentaban síntomas tras la ingestión de gambas; 20 de los cuales también estaban sensibilizados a los ácaros. También se incluyeron 5 pacientes sensibilizados sólo a ácaros.

Tras obtener el consentimiento informado de los sujetos del estudio, se les realizó una extracción de sangre y se obtuvo el suero que posteriormente se usó para la determinación de IgE específica y/o las inmunodetecciones. Como control negativo de las inmunodetecciones se utilizó un *pool* de sueros de sujetos voluntarios no atópicos.

A partir de la gamba *S. melanthero* pelada y congelada se preparó el extracto de proteínas solubles. El extracto de ácaro *D. pteronyssinus* empleado fue un extracto comercial. Ambos extractos se separaron en geles SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, y las proteínas se detectaron mediante la tinción de azul Coomassie coloidal. Para las inmunodetecciones, las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con los sueros.

La identificación de las proteínas de la gamba *S. melanthero* se realizó mediante espectrometría de masas (MS), o espectrometría de masas en tándem (MS/MS); y se corroboró realizando *dot-blots* con proteínas comerciales purificadas de diferentes fuentes animales.

Para estudiar la RC, se realizaron inhibiciones de la inmunodetección con *pools* de sueros de pacientes sensibilizados a gamba de las dos poblaciones estudiadas. También se realizaron ensayos de inhibición con TMs purificadas.

La reactividad IgE de las proteínas de la gamba tras someterlas al tratamiento térmico se analizó mediante inmunodetección.

Además, se estudió la estabilidad de las proteínas de la gamba y de la TM purificada a ser digeridas mediante ensayos *in vitro* con pepsina; y la reactividad IgE de las proteínas digeridas se examinó mediante inmunodetección.

Para determinar si el extracto digerido de gamba podría ser un buen candidato para emplearse como extracto hipoalergénico, se realizaron pruebas *in vivo* (*skin prick test*, SPT), y *ex vivo* (Test de activación de basófilos, TAB). La capacidad inmunogénica de dicho extracto se estudió mediante ensayos de proliferación de células T y ELISA de competición con el suero de conejo inmunizado con el extracto de gamba hipoalergénico.

RESULTADOS

Los sujetos del estudio se clasificaron, según los síntomas clínicos, en 3 grupos: pacientes con síntomas a ácaro y marisco (A+M), pacientes sensibilizados sólo a marisco (M), y pacientes sensibilizados sólo a ácaro (A). Así, de los 45 pacientes reclutados en Madrid: 18 pertenecen al grupo A+M, 18 al grupo M y 9 al grupo A. Veinte de los pacientes de la ciudad con clima húmedo (Lugo) se incluyeron en el grupo A+M, 4 en el grupo M y 5 en el grupo A.

Además, los pacientes de la ciudad con clima continental seco se clasificaron según los resultados de la PODCCP en pacientes con provocación oral positiva (POP) y pacientes que toleraban la gamba (PON).

El perfil alergénico de la gamba *S. melanthero* tenía numerosas proteínas que eran detectadas por más del 50% de la población estudiada. alguna de estas bandas proteicas se seleccionaron y analizaron mediante MS, identificándose como proteínas homólogas a: α -actinina (94-99 kDa), β -actina (46 kDa), fructosa bifosfato aldolasa (FBPA) (43 kDa), AK (41 kDa), TM (36-39 kDa), SCBP (17-24 kDa) y ubiquitina (5-7 kDa). Se corroboró que las proteínas identificadas eran proteínas de la gamba *S. melanthero* y que podrían ser nuevos alérgenos de dicha gamba mediante los ensayos *dot-blot* con las proteínas comerciales purificadas de diferente origen animal. El *pool* de sueros de pacientes sensibilizados a gamba tenía IgE capaz de detectar las proteínas empleadas α -actinina, β -actina y FBPA; pero no la ubiquitina.

La relevancia de las proteínas identificadas en la RC entre la gamba y el ácaro en las poblaciones estudiadas, se analizó comparando los alergogramas y frecuencias de reconocimiento de dichas proteínas entre los grupos A+M. De este modo, se dedujo que para la población con clima continental seco de Madrid, la α -actinina, β -actina, FBPA, TM y la SCBP eran las proteínas alergénicas más importantes de la gamba; sin embargo, para la población con clima húmedo, lo era la proteína identificada como ubiquitina. Cuando se comparó el porcentaje de reconocimiento de las proteínas del extracto del ácaro con PM equivalente a las proteínas identificadas en la gamba *S. melanthero*, se observó que en el extracto de ácaro, las proteínas mas relevantes eran la TM y la α -actinina para la población de clima continental, y la ubiquitina para la población con clima húmedo.

Estos resultados indican que dichas proteínas podrían estar implicadas en la RC entre la gamba y el ácaro, lo cual se confirmó mediante los ensayos de inhibición. Además, al realizar los ensayos de inhibición cruzada, se distinguió que para la población con clima húmedo el sensibilizante primario resultó ser el ácaro, y para la población con clima continental seco lo era la gamba.

Para obtener un extracto de gamba hipoalergénico, se llevaron a cabo dos aproximaciones experimentales: tratamiento térmico y digestión gástrica simulada *in vitro*. Se observó que el tratamiento térmico no modificaba la reactividad IgE de las proteínas de la gamba respecto al extracto de gamba sin tratar. No obstante, la digestión del extracto de gamba *in vitro* con pepsina produjo una disminución en la capacidad de unir IgE respecto al extracto sin digerir. También se comparó la alergenicidad de ambos extractos, sin digerir y digerido, mediante pruebas *in vivo* y *ex vivo*. Para ello se realizaron SPTs, los cuales mostraron que el extracto de gamba digerido producía pápulas de menor tamaño que las producidas por el extracto sin digerir, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Además, se analizó la actividad alergénica de ambos extractos mediante TAB. Así, cuando los basófilos de pacientes sensibilizados a gamba se incubaban con el extracto digerido de gamba, el porcentaje de basófilos activados disminuía significativamente en comparación con el extracto sin digerir. Los ensayos de proliferación de linfocitos T con ambos extractos, demostraron que el extracto digerido de gamba conservaba los epítomos T. También se comprobó que este extracto hipoalergénico era capaz de producir anticuerpos IgG en conejos inmunizados con dicho extracto, los cuales eran capaces de inhibir la unión de IgE de los pacientes a las proteínas de la gamba.

CONCLUSIONES

Los crustáceos, particularmente las gambas, son alimentos altamente alergénicos. A pesar de la elevada prevalencia de la alergia a marisco, el perfil de sus alérgenos aún no está completo. Hasta la fecha, se han identificado numerosos alérgenos de la gamba, pero tan sólo se ha identificado a la TM como responsable de la RC entre la gamba y el ácaro.

En el presente trabajo, se identifican 7 proteínas de la gamba *S. melantho*, cuatro de las cuales podrían ser nuevos alérgenos de los crustáceos. Además, se ha demostrado por primera vez que la ubiquitina, α -actinina y la arginina kinasa están implicadas en la RC entre el ácaro y la gamba.

Este hallazgo ayuda a explicar la alta RC entre los ácaros y las gambas, y constituye un nuevo paso hacia un mejor diagnóstico y tratamiento de la alergia a la gamba.

La inmunoterapia para las alergias alimentarias no es un tratamiento común debido a las posibles reacciones adversas. Por lo tanto es necesario desarrollar un tratamiento efectivo y seguro para dichas alergias.

En este trabajo, se comprueba que la TM purificada y el extracto de gamba no conservan su capacidad de unir IgE tras la digestión con pepsina. Además, se demuestra que el extracto hipoalergénico obtenido preserva los epítomos T de las proteínas de la gamba y es capaz de producir anticuerpos IgG que bloquean la unión de la IgE de los pacientes alérgicos a las proteínas de la gamba. Basándose en estos resultados, el tratamiento con pepsina podría ser un buen método para reducir la alergenidad de la gamba y así obtener una vacuna efectiva y segura para el tratamiento de la alergia al marisco en general, y de la gamba, en particular.

LISTA ABREVIATURAS

A: grupo de pacientes con sintomatología sólo con ácaro y/o con provocación oral negativa y sensibilizados a ácaros que toleran el marisco

Ac: anticuerpo

Ac 1^{ario}: anticuerpo primario

Ac 2^{ario}: anticuerpo secundario

Aca: ácaro

ACF: adyuvante completo de Freund

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia

AE: angioedema

Ag₅₀: cantidad de extracto inhibidor necesaria para conseguir un 50% de inhibición

AIF: adyuvante incompleto de Freund

AINEs: anti-inflamatorios no esteroideos

AK: arginina kinasa

AN: anafilaxia

anti-SM: suero de conejo inmunizado con el extracto cocido de la gamba *S. melanthero*

As: asma

ATP: adenosin triosa fosfato

A+M: grupo de pacientes con sintomatología frente a ácaro y marisco

BSA: albumina de suero bovino

BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina

CPA: células presentadoras de antígeno

CD: células dendríticas

CID: cámara de colisión para fragmentación de iones

CpG: oligonucleótidos con secuencias inmunoestimuladoras

C: control negativo

D: dermatitis

DMSO: dimetilsulfóxido

DO: densidad óptica

DO_i: densidad óptica con el suero del conejo inmunizado

DO_{in}: densidad óptica con el *pool* de sueros inhibidos

DO_{Nin}: densidad óptica con el *pool* de sueros no inhibidos

DO_P: densidad óptica con el suero del conejo pre-inmune

DS: disnea

EAACI: *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*, Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica

ECA: enzima convertidora de la angiotensina

ECL: sistema de detección por quimioluminiscencia

EDTA: ácido etilendiamino tetracético

EP: edema parpebral

E1, E2, E3: enzimas ligasas de ubiquitina

F: femenina

Fab: fracción variable de los anticuerpos

FBPA: fructosa bi-fosfato aldolasa

Fc ϵ RI: receptor tipo I de alta afinidad de la IgE

FGS: fluido gástrico simulado

FGS+P: fluido gástrico simulado con pepsina

G**I:** síntomas gastrointestinales

H**LA-II:** *Human Leukocyte Antigens class II*, moléculas de histocompatibilidad de clase II en humanos

H₂O_{bd}: agua bidestilada

H₂O_d: agua destilada

I**E:** índice de estimulación

Ig: inmunoglobulina

IgA: inmunoglobulina A

IgE: inmunoglobulina E

IgG: inmunoglobulina G

IgG₁: inmunoglobulina G tipo 1

IgG₄: inmunoglobulina G tipo 4

IL: Interleucina

IFN- γ : interferón-gamma

iT_{reg}: células T reguladoras inducidas o adaptativas

IUIS: *International Union of Immunological Societies*, Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas

K**Da:** kilo Dalton

kUA/L: kilo unidades por litro de sangre

L**iCo:** extracto del líquido de cocción de la gamba *S. melanthro*

M: grupo de pacientes con sintomatología sólo con marisco

Ma: marisco

MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Fly*

Max: máximo

MCC: medio de cultivo completo

MHC-II: moléculas de histocompatibilidad de clase II

MLC: *myosin light chain*, cadena ligera de la miosina

Ms: masculino

MS: espectrometría de masas

MS/MS: espectrometría de masas en tándem

N: negativo

NC: no come marisco

Net 1X: tampón de lavados

NI: no indicado

nPen m 1: tropomiosina natural de la gamba *Pennaeus monodom*

NR: no realizado

nsLTP: *non specific Lipid Transfer Proteins*, proteínas Transportadoras de Lípidos no específicas

nT_{reg}: células T reguladoras que proceden del timo

OIT: *Oral Immunotherapy Treatment*, inmunoterapia oral

OMS: Organización Mundial de la Salud

P: positivo

PBMCs: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, Células mononucleares de sangre periférica

PBS: *Phosphate Buffer Solution*, tampón fosfato

PBST: tampón fosfato con Tween-20® al 0,05%

PC: absorbancia con el medio de cultivo completo

Pcte.: paciente

PE: absorbancia con el estímulo

PHA: fitohemaglutinina

pI: punto isoelectrico

PM: peso molecular

ppm: partes por millón

Pre-inm: pre-inmune

PRP: *Pathogenesis Related Proteins*, proteínas de defensa

POA: provocación oral abierta

PODCCP: provocación oral doble ciego controlada con placebo

POF: prurito oro-faríngeo

PON: provocación oral negativa

POP: provocación oral positiva

POSC: provocación oral simple ciego

p/v: proporción peso por volumen

R: rinitis

RAST: radioalergoadsorción

RANTES: *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*

RC: reactividad cruzada

Rc: rinoconjuntivitis

rDer p 10: tropomiosina recombinante del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*

rPen a 1: tropomiosina recombinante de la gamba *Pennaeus actecus*

rpm: revoluciones por minuto

SAO: Síndrome de Alergia Oral

SBN: sobrenadante

SB5X: tampón de carga 5 veces concentrado

SCBP: *Sarcoplasmic Calcium Binding Protein*, proteína sarcoplásmica de unión de calcio

SD: *Standar Desviation*, desviación estándar

SDS: dodecilsulfato sódico

SIT: *Subcutaneous Immunotherapy Treatment*, tratamiento de inmunoterapia específico

SLIT: *Sublingual Immunotherapy Treatment*, tratamiento de inmunoterapia sublingual

SM: extracto crudo de la gamba *S. melanthero*

SMCo: extracto cocido de la gamba *S. melanthero*

SMCoD₆₀: extracto de la gamba *S. melanthero* cocida y digerido con 10 U de pepsina/μg de proteína

SPPT: *Skin Prick-Prick Test*

SPT: *Skin Prick Test*

SS: suero salino

STFi: suero de ternera fetal inactivado

s/ciclo: segundo por ciclo

T: pacientes que toleran la ingesta de gamba

TA: temperatura ambiente

TAB: test de activación de basófilos

TFI: triosa fosfato isomerasa

TGF- β : *transforming growth factor-beta*, factor de crecimiento transformante-beta

Th0: células T *helper* clase 0

Th1: células T *helper* clase 1

Th2: células T *helper* clase 2

TM: tropomiosina

TMB: tetrametilbenzidina

TMP: tropomiosina purificada de la gamba *S. melanthera*

TnC: troponina C

Treg: células T reguladoras

U: unidades

Ur: urticaria

UB: ubiquitina

VCAM-1: *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*, moléculas de adhesión de células vasculares

α -AC: alfa actinina

α -SMCo/anti-SMCo: suero de conejo inmunizado con el extracto cocido de la gamba *S. melanthera*

α -SMCoD₆₀/anti-SMCoD₆₀: suero de conejo inmunizado con el extracto cocido de la gamba *S. melanthera* y digerido con 10 U de pepsina durante 60 min

2ME: 2 β -mercaptoetanol

LISTA FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS:

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema de la Reacción Alérgica. | 4 |
| Figura 2. Clasificación de las reacciones adversas a alimentos. | 6 |
| Figura 3. Relación de los alimentos causantes de alergia y su prevalencia en el año 1992 y 2005. | 8 |
| Figura 4. Relación de alimentos que causan alergia por grupos de edad. | 8 |
| Figura 5. Diferentes rutas de captación y transporte de antígenos en la barrera intestinal. | 10 |
| Figura 6. Mecanismos de células T-regs que contribuyen al control de la respuesta inmune frente a antígenos exógenos. | 12 |
| Figura 7. Manifestaciones clínicas de la alergia a alimentos mediada por IgE. | 13 |
| Figura 8. Esquema del diagnóstico de la alergia alimentaria. | 15 |
| Figura 9. Epítomos conformacionales y secuenciales de las proteínas alergénicas. | 21 |
| Figura 10. Clasificación general de los invertebrados. | 25 |
| Figura 11. Esquema de inmunización y obtención de suero de conejos. | 48 |
| Figura 12. ELISA de titulación. | 49 |
| Figura 13. ELISA de Inhibición. | 50 |
| Figura 14. ELISA de Competición | 51 |
| Figura 15. Esquema de la clasificación de los individuos de Madrid según la sintomatología. | 57 |
| Figura 16. Representación de la frecuencia de los síntomas de los pacientes de Madrid con marisco. | 59 |
| Figura 17. Representación de la frecuencia de los síntomas de los pacientes de Madrid con ácaro. | 59 |
| Figura 18. Representación de la frecuencia de la clínica inicial de los pacientes de Lugo. | 61 |
| Figura 19. Representación de la frecuencia de síntomas de los pacientes de Lugo con el marisco. | 62 |
| Figura 20. Esquema de la clasificación de los individuos de Madrid incluidos en el estudio conforme a los resultados de la PODCCP. | 64 |
| Figura 21. Porcentajes de individuos con SPT positivo con gamba según sintomatología (A) y resultado de la PODCCP (B). | 65 |
| Figura 22. Porcentajes de individuos de Madrid que poseen IgE específica frente a gamba, nPen a 1 y <i>D. pteronyssinus</i> detectada mediante InmunoCAP®. | 66 |
| Figura 23. Valores medios de IgE específica frente a gamba, ácaro y rPen a 1. | 67 |
| Figura 24. SDS-PAGE de las proteínas (20 µg) de la gamba <i>S. melanthero</i> . | 68 |
| Figura 25. Inmunodetección con los sueros individuales de pacientes de Madrid. | 69 |
| Figura 26. Alergograma de la población de Madrid frente al extracto de gamba. | 70 |
| Figura 27. SDS-PAGE de las proteínas del extracto de la gamba <i>S. melanthero</i> . | 72 |
| Figura 28. SDS-PAGE e inmunodetección de las proteínas identificadas en la gamba <i>S. melanthero</i> . | 73 |
| Figura 29. Dot-blot de las proteínas identificadas en la gamba <i>S. melanthero</i> utilizando los sueros del conejo anti-SM y pre-Inmune. | 74 |
| Figura 30. Dot-blot de las proteínas identificadas en la gamba <i>S. melanthero</i> utilizando un pool de sueros de pacientes sensibilizados a la gamba (<i>Pool +</i>) y de individuos atópicos no alérgicos (<i>Pool -</i>). | 74 |
| Figura 31. SDS-PAGE (1) e inmunodetección de la proteína FBPA purificada comercial (1 µg/carril). | 75 |

| | |
|--|-----|
| Figura 32. Estudio mediante SDS-PAGE de los diferentes pasos de la purificación de la tropomiosina de la gamba <i>S. melanthero</i> . | 75 |
| Figura 33. Inmunodetección del extracto de la gamba <i>S. melanthero</i> (10 µg/carril) con los sueros individuales de pacientes de Lugo. | 76 |
| Figura 34. Alergograma de la población de Lugo frente a la gamba <i>S. melanthero</i> . | 77 |
| Figura 35. Inmunodetección frente al extracto del ácaro <i>D. pteronyssinus</i> (10 µg/carril) utilizando los sueros individuales de pacientes de Madrid. | 78 |
| Figura 36. Inmunodetección del extracto del ácaro <i>D. pteronyssinus</i> (10 µg/carril) con sueros individuales de pacientes de Lugo. | 79 |
| Figura 37. Alergogramas de ambas poblaciones, Madrid (A) y Lugo (B), frente al ácaro <i>D. pteronyssinus</i> . | 80 |
| Figura 38. Evaluación de la relevancia de las proteínas identificadas en la gamba <i>S. melanthero</i> . | 81 |
| Figura 39. Evaluación de la relevancia de las proteínas del extracto del ácaro <i>D. pteronyssinus</i> de PM equivalentes a las proteínas identificadas en la gamba <i>S. melanthero</i> . | 83 |
| Figura 40. Estudio de inhibición cruzada entre tropomiosinas. | 86 |
| Figura 41. Estudio de inhibición cruzada entre los extractos de gamba <i>S. melanthero</i> y el ácaro <i>D. pteronyssinus</i> en la población de Madrid. | 88 |
| Figura 42. Estudio de inhibición cruzada entre los extractos de gamba <i>S. melanthero</i> y el ácaro <i>D. pteronyssinus</i> en la población de Lugo que tiene un perfil alergénico frente a <i>S. melanthero</i> con reconocimiento de pocas proteínas. | 90 |
| Figura 43. Estudio de inhibición cruzada entre los extractos de gamba <i>S. melanthero</i> y el ácaro <i>D. pteronyssinus</i> en la población de Lugo que tiene un perfil alergénico frente a <i>S. melanthero</i> con reconocimiento de numerosas proteínas. | 91 |
| Figura 44. SDS-PAGE del extracto de gamba <i>S. melanthero</i> crudo (1), cocido (2) y líquido de cocción (3). | 93 |
| Figura 45. Inmunodetección del extracto de gamba <i>S. melanthero</i> crudo (1), cocido (2) y líquido de cocción (3), mediante un pool de sueros de pacientes alérgicos a la gamba (Pool +). | 94 |
| Figura 46. SDS-PAGE del extracto de gamba <i>S. melanthero</i> crudo (A) y cocido (B) digeridos con pepsina. | 96 |
| Figura 47. Inmunodetección del extracto de gamba <i>S. melanthero</i> crudo (A) y cocido (B) digeridos con pepsina. | 97 |
| Figura 48. SDS-PAGE de la tropomiosina purificada de la gamba <i>S. melanthero</i> (TMP) digerida con pepsina. | 98 |
| Figura 49. SDS-PAGE de la tropomiosina purificada sin digerir en H ₂ O/4°C, 37°C y en FGS/37°C. | 98 |
| Figura 50. SDS-PAGE (A) e inmunodetección (B) con el suero de un individuo que sólo presenta IgE específica frente a la TM de los extractos crudo (1), cocido (2), líquido de cocción (3) de gamba <i>S. melanthero</i> . | 99 |
| Figura 51. (A) Inmunodetección de la tropomiosina purificada digerida con pepsina. (B) Representación de la disminución de la capacidad de la TMP de unir IgE del suero empleado en la inmunodetección. | 99 |
| Figura 52. SDS-PAGE (A) e inmunodetección (B) del extracto de la gamba <i>S. melanthero</i> digerido con pepsina a diferentes pHs. | 100 |
| Figura 53. SDS-PAGE (A, C) e inmunodetección (B, D) de la TMP digerida con pepsina a pH 1,2 (A, B) y/o pH 3,0 (C, D). | 102 |

| | |
|--|-----|
| Figura 54. ELISA de Inhibición. Ensayo de inhibición de la unión de IgE de sueros de pacientes alérgicos a la gamba, utilizando como inhibidores los extractos de gamba <i>S. melanthero</i> cocida sin digerir (SMCo) y digerido (SMCoD ₆₀). | 103 |
| Figura 55. SPT con los diferentes extractos de gamba realizado sobre un sujeto sensibilizado a la gamba (paciente) y un individuo no atópico (control negativo). | 104 |
| Figura 56. Representación de la disminución del área de las pápulas del extracto de gamba cocida digerida respecto del extracto de la gamba cocida sin digerir. | 105 |
| Figura 57. Activación de basófilos inducida por los extractos de la gamba <i>S. melanthero</i> cocida sin digerir y digerido. | 106 |
| Figura 58. Activación de basófilos inducida por los extractos de la gamba <i>S. melanthero</i> cocida sin digerir y digerido. | 107 |
| Figura 59. Proliferación de linfocitos T estimulados con el extracto de la gamba <i>S. melanthero</i> cocida sin digerir y digerido. | 108 |
| Figura 60. Titulación de los sueros de los conejos inmunizados frente al extracto de la gamba <i>S. melanthero</i> cocida sin digerir (A) y digerido (B). | 109 |

TABLAS:

| | |
|--|-----|
| Tabla I. Epítomos IgE identificados en la tropomiosina. | 27 |
| Tabla II. Condiciones experimentales de las inmunodetecciones. | 42 |
| Tabla III. Condiciones experimentales de los ensayos de inhibición. | 45 |
| Tabla IV. Condiciones experimentales de los ensayos de digestibilidad de la TMP o los extractos de gamba. | 47 |
| Tabla V. Características demográficas y presentación clínica de los pacientes de Madrid. | 58 |
| Tabla VI. Características demográficas, presentación clínica y SPT a gamba de los pacientes de Lugo. | 60 |
| Tabla VII. Características clínicas de los pacientes de Madrid. | 63 |
| Tabla VIII. Resumen del análisis MASCOT de las proteínas identificadas mediante MS o MS/MS | 71 |
| Tabla IX. Evaluación de la relevancia de la frecuencia de reconocimiento de las proteínas identificadas en la gamba <i>S. melanthero</i> y sus equivalentes según el PM en el ácaro <i>D. pteronyssinus</i> en la población de Madrid y Lugo. | 84 |
| Tabla X. Áreas (mm ²) de las pápulas obtenidas mediante SPTs con los diferentes extractos de gamba probados en 5 individuos alérgicos a la gamba y un control negativo (C). | 105 |
| Tabla XI. Inhibición de la unión de la IgE de los pacientes a las proteínas del extracto de gamba cocida mediante los anticuerpos IgG de los sueros de los conejos inmunizados. | 110 |

INTRODUCCIÓN

1. ALERGIA

1.1. CONCEPTOS Y GENERALIDADES

El término **alergia**, del griego *allos*, cambiado, y *ergos*, reacción, lo introdujo Pirquet en 1906 para referirse a una respuesta inmunológica nociva [1], pero en aquel momento no se establecieron restricciones sobre el tipo de respuesta inmunológica. Posteriormente, en 1921 Prausnitz y Küstner [2], demostraron que en esta afección inmunológica estaban implicados al menos tres componentes: un antígeno desencadenante de la enfermedad (alérgeno), un factor sérico que diferencia a los individuos alérgicos de los sanos (inmunoglobulina E (IgE)) y un componente celular (mastocitos).

En 1923, Coca acuñó el término **atopia**, del griego *a-topos* que significa “fuera de lugar”, para designar un grupo de enfermedades “raras o extrañas”, como la rinitis alérgica estacional, el asma y el eccema, las cuales eran claramente diferentes de la anafilaxia ya definida por Richet y Portier en 1902, y de la alergia, definida por Pirquet en 1906 [1]. Esta distinción entre enfermedades “atópicas” por un lado y la alergia y anafilaxia por otro, creó gran controversia. Por eso, la palabra atopia pronto empezó a designar no solo la alergia en sí, sino la capacidad de hacerse alérgico [3]. Y en este sentido se pronunció en primer lugar Pepys (1975), que definió el término **atopia** como la forma de reactividad inmunológica en el individuo en la que se produce una sustancia sérica que reacciona frente a la exposición a alérgenos comunes del ambiente [4]. Esta sustancia sérica, a la que Prausnitz y Küstner denominaron “reagina” no se identificó como anticuerpo de tipo IgE hasta 1967, paralelamente por Bennich y Johansson [5] y por Ishizaka e Ishizaka [6].

En 1963, Coombs y Gell [7] utilizan el término alergia en el sentido original de Pirquet (1906) y basándose en él, realizan su clasificación de las reacciones de hipersensibilidad: hipersensibilidad tipo I o anafiláctica, hipersensibilidad tipo II o citotóxica, hipersensibilidad tipo III o reacción de Arthus (daños por complejos antígeno-anticuerpo) e hipersensibilidad tipo IV o retardada (mediada por células).

La Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (EAACI) en el año 2001 publicó una revisión de la definición de términos comunes en alergia [8], y fue revisada posteriormente en el 2003 por la Organización Mundial de Alergia [9] con el fin de unificar y definir estos conceptos:

- **hipersensibilidad**: síntomas o signos objetivos y reproducibles iniciados tras la exposición a estímulos definidos a una dosis tolerada por personas normales.
- **alergia**: reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunológicos específicos mediados por anticuerpos (Ac) o por células.
- **alergia mediada por IgE**: cuando el anticuerpo responsable de la reacción inmunológica pertenece al isotipo inmunoglobulina E (IgE).
- **antígeno**: sustancia desencadenante de la reacción inmunológica.
- **atopia**: predisposición genética para producir anticuerpos IgE en respuesta a la exposición a sustancias que son toleradas por la mayoría de la población expuesta.

1.2. LA REACCIÓN ALÉRGICA

Clásicamente, la reacción alérgica se ha considerado como una reacción de hipersensibilidad de tipo I según la clasificación de Gell y Coombs, aunque en realidad participan distintos mecanismos inmunológicos [10].

La reacción alérgica consta de dos etapas diferenciadas: una primera de sensibilización y memoria; y la segunda de provocación (**Figura 1**).

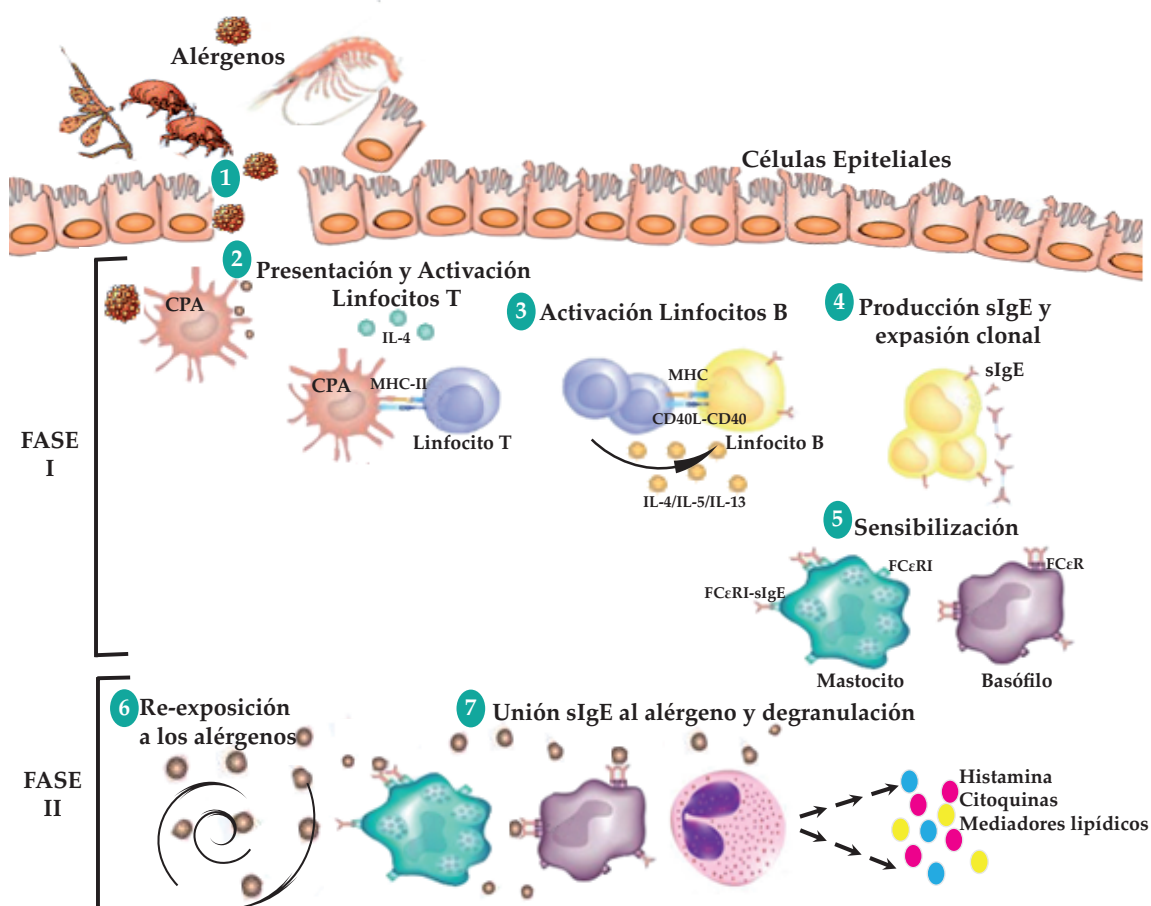


Figura 1. Esquema de la Reacción Alérgica: Fase I o de sensibilización: 1) Entrada de alérgenos en los tejidos periféricos, siendo captados por las CPA inmaduras; 2) Presentación del antígeno procesado al linfocito T y maduración del linfocito T; 3) Presentación del antígeno al linfocito B y activación del linfocito B por el linfocito T activado; 4) Expansión clonal de los linfocitos B y diferenciación a células plasmáticas productoras de IgE específica; 5) Transporte de IgE específica a los tejidos periféricos, unión de la IgE a los receptores de alta y baja afinidad de las células efectoras (basófilos y mastocitos) y sensibilización de dichas células. **Fase II o efectora:** 6) Re-exposición al alérgeno tras la fase de sensibilización; 7) Polarización de IgE positiva al alérgeno e inicio de la degranulación y liberación de mediadores inflamatorios (histamina, citocinas y mediadores lipídicos). Esquema adaptado de Gómez y cols. [11].

En la **primera fase**, las moléculas alergénicas o alérgenos penetran en el organismo a través de las mucosas o de la piel, siendo captadas y transportadas por las células presentadoras de antígeno (CPA), como células dendríticas (CD), células M y macrófagos, hasta los ganglios linfáticos. Las CPA procesan el alérgeno en pequeños fragmentos peptídicos que serán expuestos en su superficie, asociados al complejo

mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II o HLA-II en humanos) [12], siendo así presentados a los linfocitos T CD4+ e induciendo su activación y diferenciación a células T colaboradoras o T helpers de tipo 2 (Th2). Estas células secretan interleucina (IL)-4 e IL-13, entre otras, las cuales contribuyen a la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas productoras de IgE en la respuesta dependiente de linfocitos T.

Simultáneamente, se produce la interacción física entre las células T y B en la que participan diferentes moléculas de la superficie celular. Por otro lado, las células B circulantes son capaces de reconocer los antígenos gracias a los receptores que poseen en su membrana (Ig), activándose así y originando la respuesta independiente de linfocitos T.

La IgE producida por las células plasmáticas se une a los receptores de alta afinidad (FcεRI) de mastocitos, o entran en circulación y se unen a los FcεRI de los basófilos circulantes y mastocitos presentes en otros tejidos.

Tras la fase de sensibilización, un remanente de células T y B de memoria sobreviven y pueden responder ante nuevos contactos con el alérgeno.

En la **segunda fase** de la reacción alérgica, la de provocación, los mastocitos y basófilos se activan como consecuencia de una nueva exposición al alérgeno. Esta fase consta de dos etapas: reacción inmediata y reacción tardía.

En la reacción inmediata, el alérgeno se une a las regiones Fab de la IgE formando un inmunocomplejo que se une a través de los receptores Fcε a la superficie de las células efectoras (mastocitos y basófilos), produciendo su degranulación y consecuentemente la liberación de los mediadores inflamatorios, preformados o sintetizados *de novo*, responsables de la reacción alérgica temprana o inmediata, entre los que destacan la histamina y los leucotrienos. Estos mediadores inflamatorios son los responsables de los síntomas típicos de la fase inmediata de la reacción alérgica en forma de broncoespasmo, rinitis, urticaria, diarrea, vómitos y/o anafilaxia.

Esta fase inmediata de la reacción alérgica, al cabo de unas 4-6 h, va seguida de una reacción tardía caracterizada por un infiltrado inflamatorio y edema de los tejidos. La degranulación mastocitaria produce un aumento de la permeabilidad vascular, induce la expresión de moléculas de adhesión como la VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) y la secreción de quimiocinas como eotaxina y RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*) e IL-5, entre otras, dando lugar al reclutamiento selectivo de eosinófilos, monocitos y linfocitos T y B que amplifican y prolongan la respuesta inflamatoria. Esta reacción se traduce clínicamente en síntomas más persistentes como hiperreactividad bronquial, obstrucción nasal o eccema.

2. ALERGIA A ALIMENTOS

2.1. REACCIONES ADVERSAS A LOS ALIMENTOS: CONCEPCIÓN Y CLASIFICACIÓN

La diversidad de los mecanismos fisiopatológicos y las características clínicas, diagnósticas y pronósticas de las reacciones adversas tras la ingesta de un alimento, han generado gran confusión en la terminología aplicada a las reacciones alérgicas y no

alérgicas.

Reacción adversa a alimentos es un término genérico que indica una relación causa-efecto entre la ingestión de un alimento y una respuesta anormal. Si esta reacción es reproducible puede deberse a fenómenos tóxicos, farmacológicos, trastornos metabólicos o a una respuesta inmune específica.

En el año 2003 el Comité de la Organización Mundial de Alergia realizó una revisión [9], en la cual se clasifican las reacciones adversas relacionadas con la ingesta de un alimento en 3 grupos (Figura 2):



Figura 2. Clasificación de las reacciones adversas a alimentos.

a. Alergia a alimentos:

a.1. Alergia a alimentos mediada por IgE: afecta a pacientes que presentan anticuerpos IgE específicos, confirmados mediante pruebas *in vivo* o *in vitro* y/o las pruebas de provocación. El papel de las reacciones Tipo I, mediadas por IgE, en la producción de los síntomas en la alergia a alimentos está perfectamente establecido y probado a través de estudios en los que se han realizado provocaciones orales doble ciego controladas con placebo (PODCCP).

a.2. Alergia no mediada por mecanismo IgE: incluye aquellas reacciones causadas por otros mecanismos inmunológicos como inmunidad celular específica, inmunocomplejos, o por otras inmunoglobulinas distintas de la IgE, aunque no se ha valorado su relevancia clínica mediante provocaciones orales controladas.

b. Hipersensibilidad no alérgica (intolerancia a los alimentos): incluye aquellos alimentos que originan de forma causal reacciones adversas, pero no existe evidencia de un mecanismo inmunológico:

b.1. Enzimático: reacción específica del huésped pero en la que no participan mecanismos inmunológicos sino que ocurre como consecuencia de alteraciones o defectos en los mecanismos metabólicos, déficit de algunas enzimas (lipasa, lactasa...)

b.2. Mecanismo farmacológico: causado por sustancias de los alimentos que pueden ocasionar reacciones en los individuos como cafeína, histamina, etc.

b.3. Mecanismo desconocido

c. Intoxicación alimentaria: reacción adversa que ocurre tras la ingesta de sustancias tóxicas que se incorporan al alimento durante su procesamiento o por contaminación con toxinas o bacterias presentes en el alimento.

La prevalencia de reacciones adversas a alimentos en adultos supera el 30%, mientras que la alergia alimentaria mediada por IgE no suele ser mayor del 3-4% [14].

2.2. ALERGIA A ALIMENTOS MEDIADA POR IgE

Dentro de las reacciones alérgicas a alimentos, las que tienen mayor relevancia son aquellas mediadas por IgE, en las cuales la presencia de Acs de este tipo está confirmada por la historia clínica del paciente, pruebas *in vivo* e *in vitro*, así como por pruebas de provocación.

En este estudio, de ahora en adelante, cuando se hable de alergia a alimentos y/o alergia alimentaria, se refiere a la alergia a alimentos mediada por IgE.

Los alimentos constituyen la mayor carga antigénica con la que se enfrenta el sistema inmunológico humano, siendo la tolerancia la respuesta fisiológica habitual. Todavía no se conocen con exactitud cuáles son los mecanismos que conducen al desarrollo de una respuesta mediada por IgE frente a un antígeno alimentario, en lugar de a una tolerancia. Se sabe que la predisposición genética de los individuos para el desarrollo de respuestas mediadas por IgE (atopia) y la exposición (inicio, frecuencia, cantidad) a un alimento, son dos factores fundamentales. Por ello, los alimentos que más frecuentemente inducen reacciones alérgicas están condicionados tanto por la edad y la dieta, como por las condiciones existentes en distintas zonas geográficas.

Aunque la alergia alimentaria se estudia desde hace tiempo, su frecuencia real, su sintomatología y cuáles pueden ser los mejores métodos para su diagnóstico y tratamiento, han sido y son objeto de profunda controversia.

La incidencia de la alergia en general ha aumentado de forma notable en los últimos años, llegando a afectar al 25% de la población de los países desarrollados [13]. Hoy en día se estima que la alergia a alimentos afecta al 6% de la población infantil y al 3%-4% de adultos en países industrializados [14].

En España, según el estudio epidemiológico Alergológica [15], la alergia a alimentos ocupa el quinto puesto como motivo de consulta en los servicios de Alergología, detrás de la rinitis y la conjuntivitis, el asma bronquial y la alergia a medicamentos. Por otro lado, se ha observado un incremento de la prevalencia de la alergia a alimentos, que en el intervalo comprendido entre 1992 y 2005 pasó de un 4% a un 7,4%.

A pesar de que son muchos los alimentos susceptibles de causar alergia, son relativamente pocos los que provocan la mayoría de los casos de alergia alimentaria y se pueden agrupar en: leche, huevo, frutos secos, frutas, pescado y marisco, principalmente, y legumbres, vegetales y cereales, en menor medida (**Figura 3**).

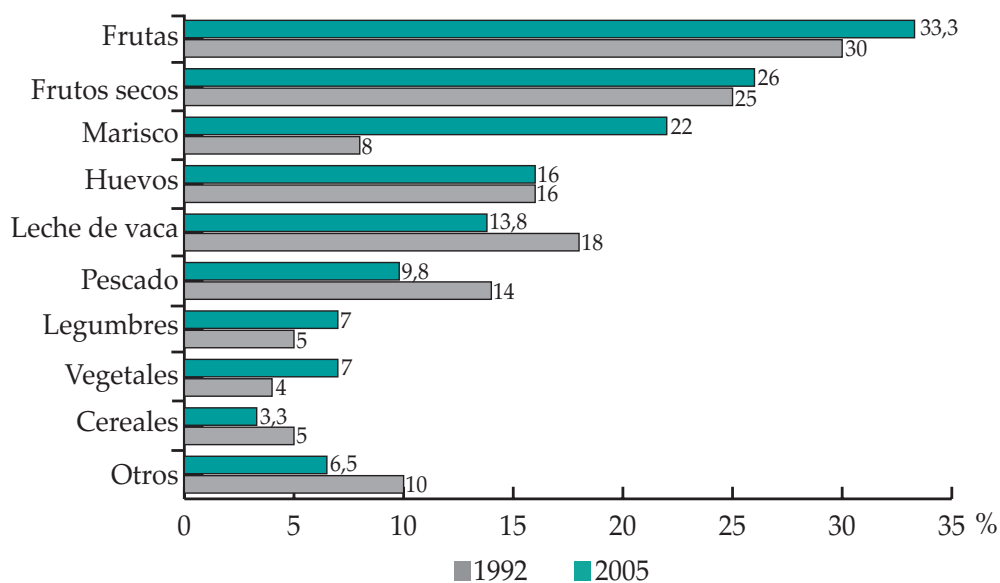


Figura 3. Relación de los alimentos causantes de alergia y su prevalencia en el año 1992 y 2005. Adaptada del estudio epidemiológico Alergológica 2005 [15].

En España se ha descrito la alergia a frutas como la causa más frecuente de alergia alimentaria en adultos [15], afectando al 30% de los pacientes que sufren alergia a alimentos (**Figura 4**), seguida de la alergia a los frutos secos (26%) y al marisco (22%). Sin embargo en la población infantil, la alergia alimentaria más frecuente es la originada por la leche de vaca, seguida del huevo (**Figura 4**).

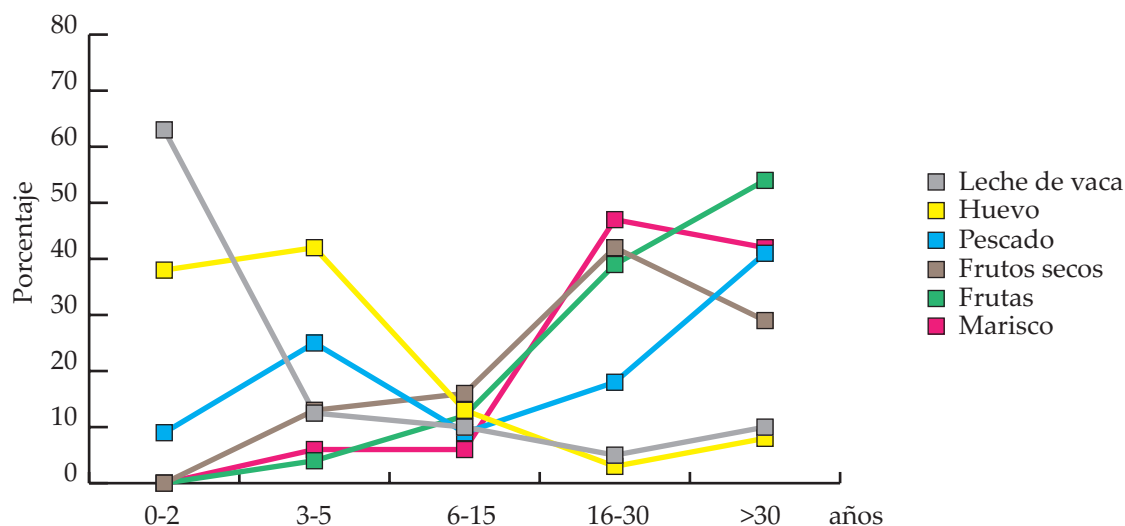


Figura 4. Relación de alimentos que causan alergia por grupos de edad. Eje Y: frecuencia de individuos afectados. Eje X: grupos según edades de los individuos. Figura adaptada del estudio epidemiológico Alergológica 2005 [15].

2.3. MECANISMO INMUNOLÓGICO DE LA ALERGIA A ALIMENTOS

2.3.1. MUCOSA INTESTINAL: TRANSPORTE Y SENSIBILIZACIÓN

Las reacciones de hipersensibilidad a alimentos mediadas por IgE pueden ocurrir después de la exposición al antígeno por diferentes rutas entre las que destacan la vía gastrointestinal, la vía respiratoria y la vía cutánea [16, 17].

Durante muchos años se presumió que las macromoléculas no eran capaces de llegar al torrente sanguíneo por el tracto gastrointestinal, apoyándose en la idea de que la presencia de secreciones mucosas, IgA y bacterias comensales actuaban en el intestino a modo de barrera. No obstante, en la actualidad es conocido que los antígenos de los alimentos pueden pasar a través del epitelio intestinal tanto en su forma nativa como parcialmente digeridos y, por tanto, interaccionar directamente con las células del sistema inmune [18]. También se sabe que la absorción de antígenos alimentarios es más significativa en niños que en adultos, con un descenso de las titulaciones de anticuerpos específicos de alimentos a partir del primer año de vida [19], lo que puede ser debido a la maduración del epitelio intestinal [20].

Los antígenos alimentarios pueden atravesar el intestino y entrar en contacto con el sistema inmune mediante múltiples mecanismos, que se hallan representados en la **Figura 5**, entre los cuales está el transporte del antígeno alimentario a través de las uniones celulares del epitelio intestinal o por endocitosis (**Figura 5A**); la absorción mediada por las células especializadas, llamadas células M, las cuales están localizadas sobre las placas de Peyer y permiten la liberación del antígeno directamente en células linfáticas (**Figura 5B**); alternatively existe la posibilidad de que las CDs se extiendan a través del epitelio alcanzando el lumen y tomen directamente los antígenos alimentarios (**Figura 5C**) [18].

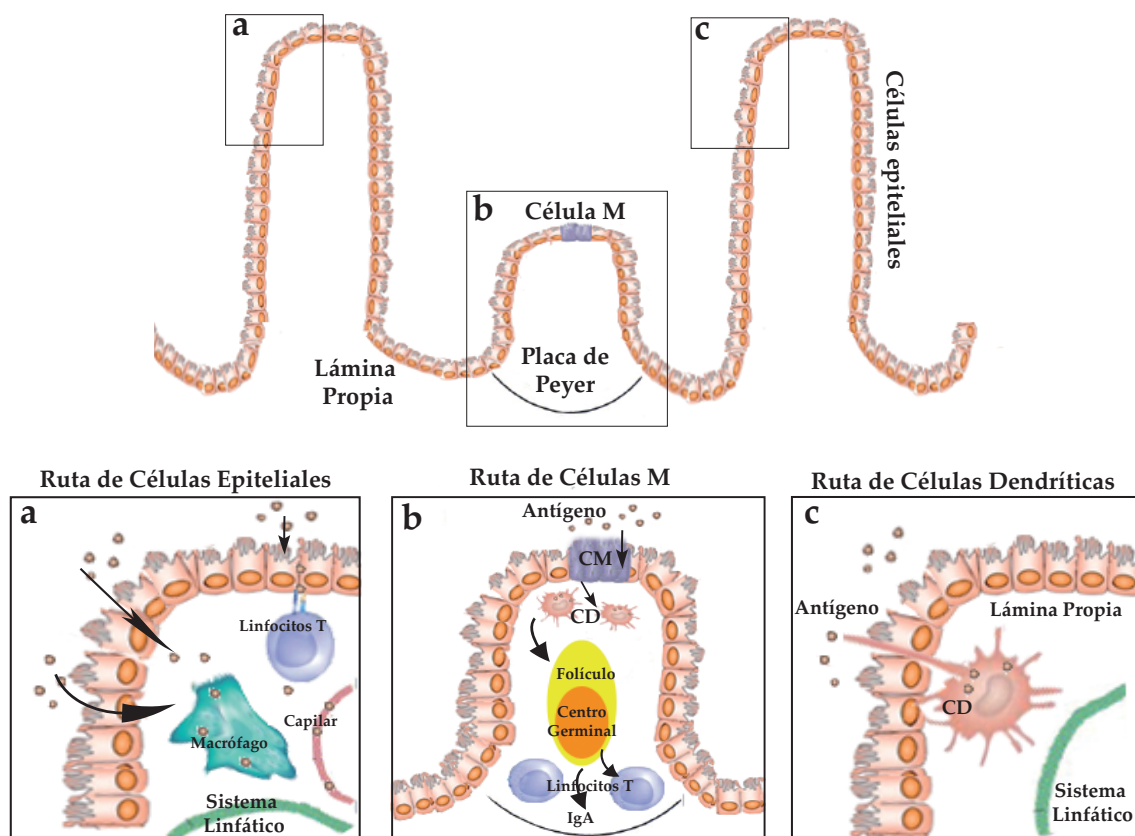


Figura 5. Diferentes rutas de captación y transporte de antígenos en la barrera intestinal: a) los antígenos solubles pueden atravesar el epitelio intestinal por endocitosis o a través de las uniones celulares y encontrarse con células T o macrófagos en la lámina propia, o alcanzar directamente un capilar sanguíneo; b) los antígenos particulados son captados por las células M que recubren las Placas de Peyer, y estas células los transportan a las CD en la región sub-epitelial y posteriormente a los folículos; c) los antígenos pueden ser captados por las CD y procesados en el lumen. Imagen modificada de Chehade y Mayer [16, 18].

El paso de antígenos a través de la barrera intestinal puede ser la génesis de la hipersensibilidad a alimentos, que es comúnmente descrita como un fenómeno que consta de dos fases. En la **primera fase**, denominada **fase de sensibilización**, los antígenos alimentarios traspasan la barrera intestinal y son capturados por las células inmunes subyacentes. Éstos son seguidamente procesados por las células inmunes especializadas, las CPA, y finalmente entran en contacto con los linfocitos Th.

En la reacción alérgica, las citocinas juegan un papel fundamental. Las citocinas son proteínas solubles que regulan la mayoría de las funciones celulares; por tanto, el perfil de citocinas presente en el medio en el que se hallan los linfocitos T vírgenes (Th0), es muy importante para determinar si estos se diferenciarán para expresar un fenotipo Th1 o un fenotipo Th2.

El interferón-gamma (IFN- γ) es una de las citocinas más representativa de la respuesta Th1, y destaca por promover la diferenciación de células Th0 a Th1 y bloquear la de células Th2, además de inhibir la producción de IgE e IgG₁ y estimular la producción de otras subclases de IgG. El IFN- γ también fomenta la producción de IL-12, que promueve la diferenciación de células Th0 a Th1 y a su vez aumenta la secreción de IFN- γ [16, 21].

Por otro lado, los individuos alérgicos desarrollan preferentemente un entorno rico en IL-4, que es una de las citocinas distintivas de la respuesta alérgica (Th2) y estimula la diferenciación de linfocitos Th0 a Th2, así como la producción de anticuerpos IgE e IgG₁. Otras citocinas partícipes de la respuesta Th2 son la IL-13, que también promueve la producción de IgE, la IL-5, que estimula la proliferación de eosinófilos, y la IL-9, que participa en la activación de mastocitos. Además, la IL-25, IL-31 e IL-33 se han asociado recientemente con la respuesta Th2 [22].

El desvío hacia una respuesta Th2 estimula a los linfocitos B para producir IgE específica del alérgeno; ésta se une a los receptores de alta afinidad (FcεRI) presentes en la superficie de los mastocitos y basófilos, y cuando se repite la ingestión del alérgeno, se produce la **segunda fase** de la respuesta alérgica, conocida como **fase efectora**. Los fragmentos alérgénicos se unen a las IgE presentes en mastocitos y basófilos, desencadenando la agregación de los receptores y la liberación de mediadores inflamatorios y vasoactivos, fundamentalmente leucotrienos, prostaglandinas e histamina. Posteriormente, la presentación del antígeno conllevará una rápida activación de células Th2, así como al reclutamiento y la activación de células efectoras tales como eosinófilos y basófilos [22].

2.3.2. BALANCE Th1/Th2 Y CÉLULAS T REGULADORAS

El modelo del balance Th1/Th2 ha tenido un papel central en la regulación de la respuesta inmune durante mucho tiempo [23]. Sin embargo, este modelo no era capaz de justificar los casos en los cuales se producía la inhibición de ambas respuestas (Th2 y Th1), los cuales podrían estar asociados a un estado de tolerancia. Tal situación fue explicada por la actividad del heterogéneo grupo de células T reguladoras (Tregs). Las células Tregs proceden fundamentalmente de dos linajes, aquellas que derivan naturalmente del timo (nTregs), y las que son inducidas o adaptativas (iTregs), que adquieren funcionalidad después de la estimulación antigénica y en presencia de un perfil de citocinas concreto [24]. Las iTregs desempeñan un papel determinante en la respuesta inmune frente a antígenos exógenos (**Figura 6**).

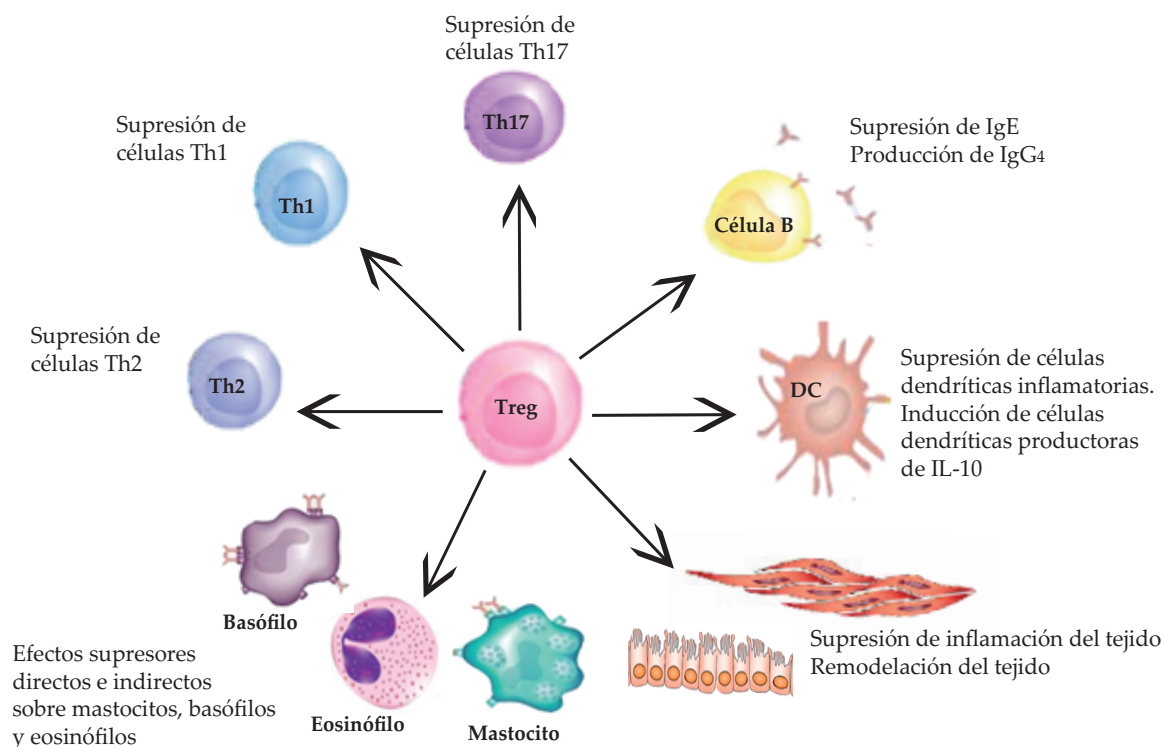


Figura 6. Mecanismos de células Treg que contribuyen al control de la respuesta inmune frente a antígenos exógenos. Adaptada de Akdis y Akdis [22].

Las células Tregs han demostrado ser capaces de modular la respuesta alérgica al inhibir células Th1 y Th2, ya sea por contacto directo o por producción de citocinas supresoras Th1 y Th2, como la IL-10 y el TGF- β [25].

La IL-10 ha sido descrita como esencial en la tolerancia periférica a alérgenos y se le atribuyen, entre otras funciones, la de suprimir la síntesis de IgE, reducir la liberación de citocinas pro-inflamatorias en los mastocitos, inducir la producción de IL-10 en células dendríticas y estimular la producción de IgG₄ e IgA [26]. El TGF- β también puede contribuir a dicha tolerancia al actuar sinérgicamente con la IL-10, reducir la síntesis de IgE, suprimir la funcionalidad de las células Th1, Th2 y Th17, participar en la diferenciación de células Th2 en Th9 y Th17, e inducir la síntesis de IgA [27]. El descubrimiento de las células Th9 y Th17 es relativamente reciente, estando ambas implicadas en procesos inflamatorios [28, 29].

Entre las funciones atribuidas a la IL-10 y TGF- β , destaca la de estimular la producción de IgA, pues se ha barajado durante mucho tiempo la posibilidad de que el desarrollo de una respuesta alérgica alimentaria pueda estar relacionada con los niveles intestinales de esta inmunoglobulina. De hecho, en modelos animales de alergias alimentarias, se han asociado bajas concentraciones de IgA en el intestino con el desarrollo de tolerancia periférica [30]. Las placas de Peyer están directamente implicadas en la síntesis de IgA, estimuladas por la presencia de IL-10 y TGF- β ; por tanto, la pérdida de la actividad de las células Tregs podría conllevar a un aumento en el peso de la respuesta alérgica Th2, dado que tanto individuos sanos como alérgicos muestran los tres repertorios de las células T específicas del alérgeno en cuestión (repertorio Th1, Th2 y Treg), es factible que la variación en la proporción de las mismas

determine si se desarrolla una respuesta inmune sana o inocua, marcada por el ratio de células específicas iTreg y Th2 [31, 32].

2.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ALERGIA A ALIMENTOS

Las manifestaciones más frecuentes en la patología alérgica alimentaria, son los síntomas cutáneos junto con la clínica digestiva [32-34]. La clínica cutánea puede presentarse como única manifestación de una reacción alérgica alimentaria o puede formar parte de una reacción generalizada, acompañándose de manifestaciones digestivas, oculares, respiratorias o incluso participando de un choque anafiláctico propiamente dicho [35] (Figura 7).



Figura 7. Manifestaciones clínicas de la alergia a alimentos mediada por IgE. Adaptada de Cerecedo [36].

2.4.1. MANIFESTACIONES CUTÁNEAS DE LA ALERGIA A ALIMENTOS

Los trastornos alérgicos alimentarios mediados por IgE pueden manifestarse a nivel cutáneo como urticaria y/o angioedema agudo. Existen otras manifestaciones clínicas a nivel cutáneo relacionadas con la alergia a alimentos y mediadas por otros mecanismos fisiopatológicos, como la dermatitis de contacto [37-39]. Por otra parte, el papel de la alergia a alimentos en la patogénesis de otras manifestaciones cutáneas como la dermatitis atópica es aún controvertido [39].

La manifestación cutánea más frecuente es la urticaria aguda (30-60%), que puede ir acompañada, o no, de angioedema [32-35] y no suele presentarse como manifestación clínica aislada, dado que alrededor de un 44% de los pacientes que presentan urticaria tienen afectados otros órganos.

La urticaria de contacto por proteínas de alimentos también es una manifestación clínica frecuente. Suele presentarse como edema y eritema local en la zona de contacto a los pocos minutos, pero en ocasiones los síntomas pueden generalizarse apareciendo urticaria generalizada, síntomas respiratorios e incluso anafilaxia.

2.4.2. REACCIONES GASTROINTESTINALES INMEDIATAS

La clínica digestiva inmediata junto con la clínica cutánea forman el patrón característico de presentación de la alergia alimentaria mediada por IgE [40, 41]. Aparece típicamente en un intervalo de tiempo comprendido entre los pocos minutos hasta las 2 h tras la ingesta del alimento. Dentro de dichas manifestaciones se incluyen náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea [42]. Aunque esta clínica puede aparecer de forma aislada, habitualmente aparece asociada a afecciones de otros órganos, ocasionando manifestaciones cutáneas, respiratorias, oculares o incluso anafilaxia [41].

El Síndrome de Alergia Oral (SAO) podría considerarse como el equivalente de la urticaria aguda de contacto a nivel orofaríngeo. Típicamente es producido por la ingesta de frutas y vegetales crudos [43]. Clínicamente se manifiesta como prurito orofaríngeo, acompañado generalmente de eritema y angioedema perilabial de forma inmediata tras la ingesta. Puede acompañarse de edema lingual e incluso edema de úvula con el consiguiente compromiso respiratorio.

2.4.3. MANIFESTACIONES RESPIRATORIAS DE LA ALERGIA A ALIMENTOS

La sintomatología respiratoria es menos frecuente que la clínica dermatológica y digestiva, y usualmente se asocia a un cuadro generalizado de anafilaxia. La incidencia de sintomatología respiratoria inducida por alergia a alimentos, se estima entre un 2 y 8% en niños que previamente presentaban asma bronquial [44, 45].

La rinitis es un síntoma que raramente aparece aislado. Si bien, es el síntoma respiratorio más frecuente, se estima que hasta un 70% de los síntomas respiratorios en las provocaciones orales a alimentos corresponden con la rinitis [46].

El asma inducido por inhalación de alimentos, es decir, por los vapores de cocción de dichos alimentos, es la principal causa del asma ocasionada en el ambiente doméstico y en el lugar de trabajo. Se ha estimado que entre los casos de asma en adultos, especialmente en el asma ocupacional, el 1% podría estar relacionado con la inhalación de alérgenos alimentarios [47].

2.4.4. ANAFILAXIA INDUCIDA POR ALERGIA A ALIMENTOS

La alergia alimentaria es la principal causa de reacciones anafilácticas tratadas en los servicios de urgencias hospitalarias [48-52]. La anafilaxia es un tipo de reacción alérgica potencialmente mortal, cuyos síntomas más característicos son: dificultad respiratoria, mareos, arritmias, enrojecimiento de la piel y vómitos. Aunque cualquier alimento puede provocar una reacción alérgica, ciertos alimentos se han citado más

frecuentemente como causantes de anafilaxia grave o mortal, entre los que destacan los cacahuetes, las nueces y los mariscos; y ocupando un segundo lugar la leche, el huevo, el pescado y otros [50, 53]. Existen algunos factores de riesgo que hacen que las reacciones anafilácticas sean más frecuentes, como la existencia de asma bronquial previa, la incapacidad para reconocer la gravedad de las reacciones por negación de los síntomas o por presentación “atípica”, ingestión inadvertida de alérgenos ocultos en alimentos procesados [54], así como tratamientos inadecuados como la escasa utilización de adrenalina por los médicos de los servicios de urgencias hospitalarias, que emplean habitualmente corticoides y antihistamínicos [49, 52, 55, 56].

2.5. DIAGNÓSTICO DE LA ALERGIA A ALIMENTOS

El diagnóstico de la alergia a alimentos comienza con la historia clínica del paciente, valorando los síntomas referidos por el paciente y evaluando la posible relación causa-efecto. Seguidamente ha de confirmarse la existencia de un mecanismo de hipersensibilidad inmediata mediada por IgE (**Figura 8**).

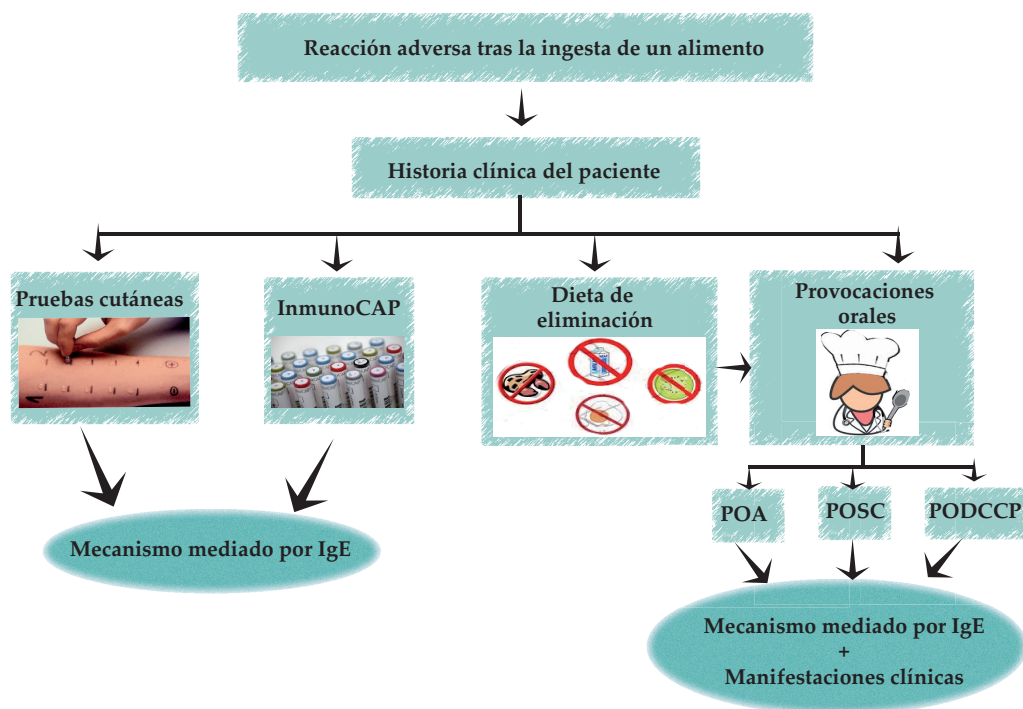


Figura 8. Esquema del diagnóstico de la alergia alimentaria.

Para ello se utilizan diferentes métodos, como las pruebas cutáneas, que son de lectura inmediata, como el *Skin Prick Test* (SPT) realizado con extractos comerciales o el *Skin Prick-Prick Test* (SPPT), utilizando como reactivo el alimento en cuestión.

El diagnóstico clínico se complementa con la **cuantificación de la IgE sérica total y/o de la IgE específica**. La cuantificación de la IgE total permite distinguir a los individuos atópicos de los no atópicos. Esta diferenciación presenta ciertas limitaciones, ya que hay que tener en cuenta las variaciones de esta inmunoglobulina según la época del año o la inmunoterapia. Debido a esto, puede resultar de mayor utilidad la determinación de la IgE específica frente a determinados alimentos o alérgenos, utilizando las técnicas de RAST (radioalergoadsorción) o ImmunoCAP®. Esta última es una técnica enzimo fluorométrica que no presenta los inconvenientes del uso de Acs marcados con radioactividad (I_{125}) que sí utiliza el RAST, y además es más sensible y específica.

Como ya se ha mencionado anteriormente, estas pruebas principalmente demuestran que existe un mecanismo subyacente mediado por IgE, pero no ha de ir necesariamente asociado a manifestaciones clínicas. Por ello, cuando la historia clínica no muestra una clara relación causa-efecto es necesario recurrir a las pruebas de provocación oral, las cuales permiten comprobar si existe relación entre la ingestión y los síntomas, confirmando o desmintiendo la existencia de alergia alimentaria [57].

La **dieta de eliminación** también se puede considerar como un método diagnóstico en los casos en los que la clínica es de aparición inmediata, pero aunque se produzca mejoría clínica, la dieta de eliminación por si sola no sirve como prueba diagnóstica y debe confirmarse mediante una provocación controlada con el alimento.

Entre las pruebas de provocación de alergia a alimentos se encuentran tres tipos:

- **Provocación Oral Abierta (POA)**, en la cual se administra por vía oral el alimento sospechoso de causar la alergia

- **Provocación Oral Simple Ciego (POSC)**, que consiste en administrar el alimento sospechoso de manera encubierta por otra fórmula, sin que el paciente sepa lo que ingiere.

- **Provocación Oral Doble Ciego Controlada con Placebo (PODCCP)**, que consiste en administrar distintas dosis del alimento sospechosos y del placebo en distintos momentos de la prueba y sin conocimiento por parte del paciente ni del facultativo. Esta prueba es la más fiable y abarca no solo el diagnóstico de alergia alimentaria, sino todas las reacciones adversas a alimentos [58].

La POPCCP es la prueba patrón de referencia en el diagnóstico de las reacciones adversas a alimentos [59-64]. Sin embargo implica un alto coste sanitario y social, ya que requiere la colaboración de un mayor número de personal sanitario, consume mucho tiempo y su negatividad debe ser confirmada mediante una POA. Las indicaciones de cada provocación están recogidas en el reciente artículo de opinión de EAACI [63].

Las técnicas de diagnóstico *in vivo* de la alergia a alimentos se basan en la utilización de extractos alérgenos y su eficacia depende de la calidad de los mismos. Un extracto alérgico es un producto biológico resultante de la extracción de los componente alérgenos del alimento. Se pueden distinguir diferentes tipos de extractos [65]:

- **Extractos naturales parcialmente purificados**: se obtienen realizando una extracción proteica a partir de la fuente alérgica. Contienen gran cantidad de componentes, de los cuales, no todos son los responsables de sensibilizar al individuo

alérgico. Además, a la hora de producir estos extractos existen ciertos inconvenientes como, la falta de estandarización en su producción debido a la variabilidad del método de extracción, la elección del material (especie o variedad de la fuente alérgica), el almacenamiento de los extractos y/o la posible degradación de las proteínas alérgicas.

- **Alérgenos naturales purificados:** a partir del extracto proteico completo se aíslan estos alérgenos. La calidad de estos alérgenos purificados depende del proceso de purificación y su rentabilidad económica. La posibilidad de utilizar alérgenos purificados en el diagnóstico de alergias alimentarias proporciona un panel de proteínas alérgicas aisladas de un mismo alimento, permitiendo diferenciar el alérgeno sensibilizante, realizándose así un diagnóstico más exhaustivo.

- **Alérgenos recombinantes:** permiten la producción estandarizada de los alérgenos de manera ilimitada y económica. No obstante también presenta limitaciones, dado que la clonación de un alérgeno no siempre es fácil, a lo que hay que añadir que los alérgenos recombinantes no poseen todas las isoformas existentes en la naturaleza y que es necesario validar la respuesta frente al alérgeno natural purificado, así como la relevancia clínica de la forma recombinante.

Actualmente, en el diagnóstico de la alergia se está empleando la técnica de los **microarrays**, los cuales permiten probar en un solo ensayo un gran número de alérgenos [66-68]; además de requerir menor cantidad de alérgenos y de suero de paciente. En esta técnica diagnóstica, en la cual los alérgenos se encuentran en cantidades mínimas y no en exceso para captar IgE, se mimetizan las condiciones *in vivo* del paciente [69].

2.6. TRATAMIENTO DE LA ALERGIA A ALIMENTOS

El tratamiento de la alergia alimentaria se basa, por un lado en controlar o estabilizar los síntomas del paciente que presenta una reacción alérgica, y por otro, en controlar la enfermedad.

Las deficiencias en el tratamiento de la alergia alimentaria contrastan con los exitosos tratamientos que se llevan a cabo en la actualidad en otras enfermedades alérgicas, tales como el asma, la rinitis alérgica y/o la anafilaxia causada por veneno de insecto o pneumoalérgenos [70].

Hasta la fecha, el tratamiento preventivo de la alergia alimentaria consiste en la completa eliminación del alimento causante de dicha alergia de la dieta, lo cual puede ocasionar ciertos inconvenientes tanto en la vida del paciente, como de las personas de su entorno, además de producir problemas nutricionales provocados por la eliminación del alimento en cuestión. Otro problema de este tratamiento es el cumplimiento de la dieta de forma exhaustiva, ya que en ocasiones es difícil eliminar los alimentos, sobre todo cuando se trata de alimentos esenciales, como la leche o el huevo, o cuando pueden encontrarse ocultos (alérgenos ocultos) en comidas elaboradas. En las dietas de eliminación también son importantes los problemas psico-sociales que pueden generar debido a la sobreprotección de los pacientes y por el esfuerzo económico y emocional que suponen. Finalmente pueden existir problemas de reintroducción, tales como que el paciente presente aversión por los alimentos suprimidos durante periodos prolongados [58].

Estos hechos plantean la necesidad de la búsqueda de nuevas estrategias para el diseño de formas de diagnóstico e inmunoterapia más seguras y más eficaces.

2.6.1. NUEVOS AVANCES EN EL TRATAMIENTO DE LA ALERGIA A ALIMENTOS

La caracterización a nivel inmunológico y molecular de numerosos alérgenos alimentarios, así como los avances en el conocimiento de la naturaleza humoral y celular de las respuestas inmunes que derivan en alergia o tolerancia, están permitiendo estudiar y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Entre las estrategias desarrolladas para el tratamiento de la alergia destaca la inmunoterapia subcutánea específica o SIT (*Subcutaneous Immunotherapy Treatment*), la cual consiste en la administración de alérgenos en dosis crecientes, por periodos variables de tiempo, hasta alcanzar la dosis de mantenimiento consiguiendo así la tolerancia clínica e inmunológica [71, 72]. Esta terapia se ha empleado con éxito en los casos de alergia a pólenes, y también se ha visto una cierta mejoría en algunos casos de alergia a alimentos ocasionados por reactividad cruzada con pólenes [73]. Sin embargo, en los estudios de SIT con alérgenos alimentarios se pueden producir efectos secundarios adversos como la anafilaxia recurrente [14], y es por ello que esta terapia con alérgenos alimentarios se ha abandonado [74].

En la actualidad, con el fin de evitar las reacciones adversas de las proteínas o extractos alergénicos naturales, se están desarrollando nuevas estrategias [57], que según la revisión de Sicherer y Sampson [73], pueden clasificarse en :

2.6.1.1. TERAPIAS ESPECÍFICAS DE ALÉRGENO

Basándose en el conocimiento de la estructura primaria de los alérgenos, se están aplicando diversas tecnologías para el desarrollo de nuevas vacunas alérgeno-específicas [75, 76]. Con estas terapias, en caso de ser efectivas, el alimento puede consumirse en cantidades normales sin la aparición de síntomas, aunque tienen la limitación de que para cada tipo de alimento a tratar sería necesaria una terapia específica.

a. Inmunoterapia sublingual (SLIT) y oral (OIT) con alérgenos alimentarios estándar: se basan en la exposición gradual del individuo alérgico a la proteína alimentaria nativa, evitando así la reacción alérgica aguda que podría producirse si ese contacto fuese más prolongado en el tiempo (como ocurre con la inmunoterapia subcutánea). Los estudios realizados de SLIT con alimentos no son numerosos, aunque los resultados obtenidos en la alergia a la avellana [77] y a la leche [78] son prometedores. En el caso de la OIT, se han obtenido resultados interesantes en poblaciones infantiles de pacientes alérgicos al huevo y a la leche, con niveles de IgE específicos elevados. Sin embargo, se han descrito efectos secundarios en individuos que sufrían paralelamente infecciones o que realizaban ejercicio. Hasta la fecha, los estudios de OIT sugieren que este tratamiento induce desensibilización en los pacientes tratados,

siempre y cuando el alimento problema sea ingerido a diario para evitar la aparición de síntomas; pero no induce tolerancia [79], es decir, cuando el alimento puede tomarse sin experimentar síntomas aun con periodos de abstinencia.

b. Proteínas modificadas genéticamente: esta estrategia se basa en la modificación genética de los sitios de unión a IgE, eliminándolos o mutándolos, sin que la proteína pierda su capacidad de estimular a las células T. Esta estrategia se ha aplicado con éxito para obtener mutantes hipoalergénicos de cacahuete [80, 81], pescado [82] y manzana [83]. Actualmente se están planteando realizar estudios clínicos en humanos con el pescado y el melocotón [84].

c. Inmunoterapia con péptidos: se están desarrollando vacunas compuestas por varios péptidos sintéticos y solapantes que cubran la secuencia de la proteína alérgica nativa. Esta estrategia se ha aplicado en un modelo murino, observándose inhibición de la producción de los anticuerpos IgE y preservación de la respuesta T celular [85].

d. Plásmidos de ADN: estrategia basada en la utilización de plásmidos de ADN bacteriano que codifican para el alérgeno en cuestión, el cual, al producirse de manera endógena, podría no estimular una respuesta alérgica. Esta técnica se ha utilizado con éxito con el alérgeno del latex Hev b 5 [86], del abedul Bet v 1 [87] y para el alérgenos del cedro japonés, Cry j 1 [88]. Puesto que en modelos murinos se ha visto que la respuesta es dependiente de la cepa de ratones utilizada [89], cabe esperar que en humanos también se produzca esta variabilidad en cuanto a la respuesta.

e. Modificaciones de los adyuvantes: utilización de secuencias inmunoestimuladoras de ADN con motivos CpG (nucleótido citosina y guanina unidos por un grupo fosfato) junto con los alérgenos. Los CpG son adyuvantes bacterianos que provocan una desviación de la respuesta inmune hacia Th1, activando las CPA, las células citotóxicas y las células B [90]; es decir, potencian la inmunogenicidad minimizando la alergenicidad [91].

2.6.1.2. TERAPIAS NO ESPECÍFICAS DE ALÉRGENO

Algunas de estas estrategias pueden alterar el umbral de reactividad alérgica, como los Acs anti-IgE; otras parecen proporcionar curas más a largo plazo para la alergia alimentaria, tales como la medicina tradicional china con hierbas:

a. Anticuerpos anti-IgE: son anticuerpos monoclonales anti-IgE que bloquean su fijación a los receptores específicos de las células efectoras (mastocitos), reduciendo de este modo la respuesta alérgica [92]. Una de sus mayores ventajas es su capacidad para tratar múltiples sensibilizaciones. No se sabe si la disminución en la sensibilidad permanece en el tiempo o cesaría tras suspender el uso del fármaco. Parece posible que la combinación de la terapia anti-IgE junto con la inmunoterapia específica con alérgenos, mejore la eficacia y el límite de los efectos adversos de la inmunoterapia [93, 94].

b. Citocinas y anti-citocinas: se han realizado estudios en modelos animales murinos en los cuales se administraron IL-10 [95] o TGF- β [96], consiguiendo evitar la sensibilización alérgica mediada por IgE, y aumentando la tolerancia de la mucosa oral, respectivamente. Estos trabajos ponen de manifiesto que estas moléculas podrían utilizarse en terapias humanas mejorando los síntomas clínicos y la calidad de vida de los pacientes, como ha demostrado Stein y cols. [97] utilizando un anticuerpo

monoclonal humano IgG anti-IL-5 en pacientes con esofagitis eosinofílica, consiguiendo disminuir los niveles de eosinófilos drásticamente.

c. Medicina tradicional china a base de hierbas medicinales: Li y cols. [98] han desarrollado una preparación de 9 hierbas medicinales chinas, denominadas FAHF-2, las cuales bloquean completamente los síntomas de anafilaxia en un modelo murino de alergia al cacahuete. Este preparado proporcionó a los ratones seis meses de protección frente a la alergia al cacahuete, tras los cuales se les volvió a administrar dicho preparado, proporcionándoles de nuevo protección. Recientemente se han iniciado estudios en humanos (fase I) con estas hierbas para demostrar su eficacia como tratamiento para la alergia [98].

3. ALÉRGENOS

3.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES

Un **alérgeno** es aquella molécula capaz de provocar reacciones alérgicas Tipo I mediadas por IgE [99]. Por lo general se trata de moléculas de naturaleza proteica, aunque también se ha asociado capacidad alérgica a los hidratos de carbono [100, 101].

Para que una molécula se comporte como un alérgeno debe cumplir determinadas características, tales como la estabilidad estructural; pero también son importantes la dosis y la ruta de exposición a dicho alérgeno.

Algunos estudios afirman, que cualquier proteína que entre en contacto con el sistema inmune en cantidad suficiente y en el contexto adecuado, puede provocar la activación del sistema inmune de un individuo atópico [102]. No obstante, otros trabajos, basándose en el hecho de que existen pocas familias de proteínas que engloban los alérgenos y que además entre éstas las funciones biológicas se repiten, sustentan que cualquier proteína no puede convertirse en alérgeno [103, 104].

Actualmente, aún no se conocen las causas de la alergenidad, pero se barajan varias hipótesis: el mimetismo con proteínas endógenas, que posean propiedades surfactantes; la capacidad para unir ligandos o la hipótesis de la actividad biológica, según la cual la mayoría de los alérgenos son enzimas, inhibidores enzimáticos, proteínas reguladoras o de transporte.

Dentro de una determinada fuente alérgica existen alérgenos principales o mayoritarios, reconocidos por más del 50% de los pacientes alérgicos a esa fuente; mientras que los alérgenos reconocidos por menos de dicho porcentaje de pacientes se consideran alérgenos minoritarios o secundarios [105].

La zona de los alérgenos que es reconocida por las IgEs son los determinantes antígenicos o **epítomos IgE**, formados por un número variable de aminoácidos, y que pueden ser secuenciales (continuos) o conformacionales (discontinuos) (**Figura 9**). Los **epítomos secuenciales**, como su nombre indica, están formados por la secuencia lineal de los aminoácidos presentes en la estructura primaria de la proteína; mientras que en los **epítomos conformacionales** participa la estructura tridimensional del alérgeno, por

lo tanto pueden estar formados por aminoácidos muy distantes, pero que se encuentran próximos una vez que la proteína está plegada [106].

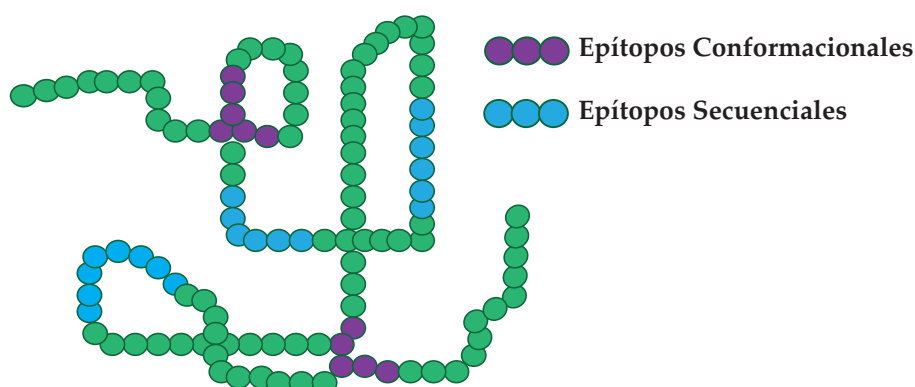


Figura 9. Epítomos conformacionales y secuenciales de las proteínas alergénicas. Modificado de Alessandri y cols. [107].

Actualmente las características estructurales y/o funcionales que hacen que una determinada molécula resulte alergénica, se desconocen, aunque tampoco se tiene la certeza de que existan. A pesar de ello, muchos de los alérgenos descritos presentan una serie de características físico-químicas comunes que parecen tener importancia en su alergenicidad [106, 108, 109]:

1. Son proteínas solubles.
2. Su peso molecular (PM) oscila, generalmente, entre 5 y 70 kDa, lo que les permite el paso a través de las mucosas, y ser capaces de activar la respuesta inmune.
3. Presentan una elevada potencia biológica, de manera que pequeñísimas cantidades son suficientes para producir reacciones inmediatas en personas sensibilizadas.
4. Contienen epítomos T capaces de inducir una respuesta Th2.
5. Necesitan tener al menos 20 aminoácidos para poseer un mínimo de dos epítomos B que les permitan unirse a los receptores de la IgE.

Los alérgenos alimentarios, además de las características generales de los alérgenos, presentan unas características especiales. Así, si el alérgeno produce la sensibilización por la vía digestiva, debe ser estable al calor, ya que muchos de los alimentos se ingieren cocinados; además debe poseer estabilidad frente al pH ácido y frente a enzimas proteolíticas, propiedades que favorecen la llegada de la molécula intacta a la superficie de absorción del intestino delgado. En el caso de alérgenos que provocan reacciones alérgicas a alimentos en los que la sensibilización primaria se produce a nivel del aparato respiratorio o de la piel, éstos son lábiles, es decir, no resisten el tratamiento térmico, ni la acción del pH o de las enzimas proteolíticas.

Las propiedades intrínsecas de los alérgenos alimentarios, además de influir en la presentación clínica, repercuten en la calidad de las pruebas diagnósticas empleadas [110].

3.2. NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN

La nomenclatura de los alérgenos inductores de reacciones de hipersensibilidad de tipo I [111], se basa en la propuesta de 1986 realizada por la IUIS (*International Union of Immunological Societies*) y de la OMS (Organización Mundial de la Salud), que fue revisada en 1994 [112]. Según estos criterios, los alérgenos se nombran utilizando las tres primeras letras del género, la primera letra de la especie (o las dos primeras si pudiese inducir a error) y un número arábigo correlativo, que se refiere al orden de identificación, pero intentando que el mismo número se utilice para alérgenos homólogos (aunque éste no es un requisito indispensable). Así, por ejemplo, Pen a 1 y Hom a 1, se refieren a las tropomiosinas de la gamba *Penaeus aztecus* y de la langosta *Homarus americanus*, respectivamente; mientras que la tropomiosina de los ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Blomia tropicalis* se denominan Der p 10 y Blo t 10, respectivamente.

Larramendi [113] propone una nueva clasificación para los alérgenos alimentarios que combina la naturaleza intrínseca de los alérgenos, la vía de sensibilización y los síntomas que su ingestión o inhalación provocan, distinguiendo así dos tipos de alérgenos alimentarios:

- Los alérgenos alimentarios estables, resistentes a temperaturas elevadas, pH ácido y digestión enzimática, que tras su ingestión son capaces de inducir sensibilizaciones mediadas por IgE en individuos genéticamente predispuestos, y que producirán síntomas, frecuentemente sistémicos, en sucesivas exposiciones por vía digestiva. La β -lactoglobulina de la leche, Ara h 1 del cacahuete o Pru p 3 del melocotón [99, 114-118], son ejemplos claros. Este tipo de alérgenos alimentarios se denominan **alérgenos completos** [99], y este tipo de alergia alimentaria se ha clasificado como **alergia de clase I** [119], en la que la sensibilización a las proteínas alimentarias ocurre por vía gastrointestinal y es lo que Larramendi [113] considera **alergia a alimentos primaria**.

- Los alérgenos lábiles de los alimentos, no resisten el tratamiento térmico ni la exposición al pH gástrico ni a las enzimas digestivas, por lo que se supone que no son capaces de inducir sensibilizaciones a través de la vía digestiva. Sin embargo, estos alérgenos sí pueden desencadenar síntomas en individuos sensibilizados generalmente por vía respiratoria y debidos a la reactividad cruzada [117]. Estos alérgenos alimentarios se denominan **incompletos** [99], responsables de la **alergia de clase II** [119], en la que la sensibilización a un aeroalérgeno ocurre por vía respiratoria y la reactividad cruzada con el alimento provoca los síntomas tras su ingesta, y que constituyen la **alergia a alimentos secundaria** de la clasificación de Larramendi [113]. Un ejemplo de este tipo de alergia alimentaria es el SAO producido por manzana en pacientes alérgicos al polen de abedul, en los que la sensibilización primaria se produce al alérgeno mayoritario del abedul, Bet v 1, por vía inhalada, siendo reconocido secundariamente el alérgeno homólogo en la manzana, Mal d 1 [99, 113].

4. REACTIVIDAD CRUZADA

El fenómeno de la reactividad cruzada (RC) ocurre cuando se produce una sensibilización a un alérgeno, el cual induce síntesis de anticuerpos IgE específica, que posteriormente, pueden reconocer antígenos presentes en proteínas homólogas procedentes de otras fuentes alérgicas.

Estas proteínas poseen diferentes grados de similitud estructural y de secuencia, lo cual determina la presencia de epítomos comunes reconocidos por un mismo tipo de anticuerpo IgE.

Para que exista RC entre dos alérgenos, éstos han de presentar una homología de secuencia parcial o poseer un epítomo IgE común.

Las proteínas conservadas filogenéticamente poseen una estructura molecular y de secuencia muy similar, por lo que tienen mayor posibilidad de compartir epítomos secuenciales y conformacionales. Para que exista RC es necesaria una homología de secuencia superior al 35% en una longitud de 80 aminoácidos o al menos identidad en 8 aminoácidos contiguos; aunque también se han descrito casos de RC entre alérgenos con tan sólo un 35% de homología de secuencia [120].

En el proceso de RC, a pesar de que no haya previa exposición al alérgeno, se puede reaccionar frente a éste con clínica de alergia inmediata debido a una sensibilización preexistente a un alérgeno altamente homólogo [121]. Sin embargo, esto no siempre ocurre así, dado que a veces el reconocimiento *in vivo* o *in vitro* del alérgeno responsable de la RC no ocasiona síntomas clínicos. Un individuo puede estar sensibilizado a dos o más fuentes alérgicas debido a la RC, pero no necesariamente debe presentar síntomas clínicos frente a todas ellas. Por lo tanto es importante señalar que la RC es un concepto inmunológico más que clínico.

Puesto que la traducción clínica de los fenómenos de RC entre alérgenos es muy variable, Ferreira y cols. [122] han propuesto que el término de **reactividad cruzada** se reserve para aquellas manifestaciones clínicas bien definidas por hipersensibilidad a una fuente alérgica a la que no ha habido exposición previa.

Por otro lado, el término **co-reconocimiento**, se utiliza para describir la mayoría de las reacciones IgE donde la co-exposición a diferentes fuentes alérgicas con proteínas homólogas no permite la identificación del alérgeno sensibilizante primario; y el término **co-sensibilización** se refiere a la presencia de IgE frente a epítomos no compartidos entre moléculas alérgicas.

La similitud entre las proteínas responsables de la RC está determinada por la proximidad filogenética de las especies comparadas, pero no siempre es así. Los **panalérgenos** son proteínas ubicuas en la naturaleza, no relacionadas taxonómicamente y que presentan RC.

Los principales panalérgenos implicados en los procesos de RC entre fuentes alérgicas de origen vegetal son:

1. Profilinas: es uno de los principales panalérgenos vegetales; así pacientes sensibilizados a estas proteínas reaccionan frente a una amplia gama de fuentes vegetales [123-125], ocasionando los síndromes látex-polen [126], látex-frutas [127] y pólenes-frutas [128].

2. Proteínas de defensa (PRP, *pathogenesis related proteins*): Bet v 1 y homólogos de Bet v 1 (PR-10), constituyen un grupo de alérgenos responsables de la RC entre pólenes de la familia de las fagáceas (abedul, castaño, avellano) y alimentos de la familias de las rosáceas (manzana, melocotón, albaricoque) y de las umbelíferas (apio, zanahoria) [76, 129].

3. Proteínas de transferencia de lípidos no específicas (nsLTP): estas proteínas inicialmente se describieron en frutas de la familia *Rosaceae* [130, 131] y posteriormente se han descrito en gran variedad de alimentos como frutos secos [132], cereales y vegetales, así como en el látex. También se han descrito en diferentes pólenes: del olivo (Ole e 7), del plátano de sombra (Pla a 3), artemisia (Art v 3), ambrosia (Amb a 6), parietaria (Par j 1 y Par j 2). Por lo tanto también son responsables del síndrome alérgico polen-fruta.

4. Carbohidratos: los azúcares presentan escasa diversidad estructural por lo que pueden ser también responsables de determinados casos de RC. Las glicoproteínas, al presentar menor variabilidad que las proteínas, parecen tener un papel importante en la sensibilización, lo cual permite explicar la aparición de fenómenos de RC entre especies alejadas filogenéticamente. Generalmente se tratan de oligosacáridos con residuos de fucosa y xilosa unidos a la cadena peptídica por enlace N-glicosídico [100].

Entre los alimentos de origen animal, los panalérgenos hasta ahora descritos son:

1. Parvalbúmina: es el alérgeno principal de diferentes especies de pescado, y responsable de la RC entre peces y anfibios [133].

2. Tropomiosina: alérgeno principal descrito en distintas especies de gambas, camarones, langostas, insectos y otros crustáceos [134-139], y cuya RC se detallará en el apartado 5.4. de este capítulo.

5. ALERGIA AL MARISCO

5.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DEL MARISCO

Los mariscos son animales invertebrados pertenecientes al filo *Arthropoda* (del griego *arthron*, articulación; y *pous*, pie), o al filo *Mollusca* (del latín *molluscum*, blando). El filo de los artrópodos es el más extenso del reino animal (*Eumetazoa*), incluyendo además de los crustáceos, los insectos y arácnidos. En la **Figura 10** se muestra la clasificación taxonómica de los filos del reino animal entre los que se encuentran clasificados los diferentes mariscos.

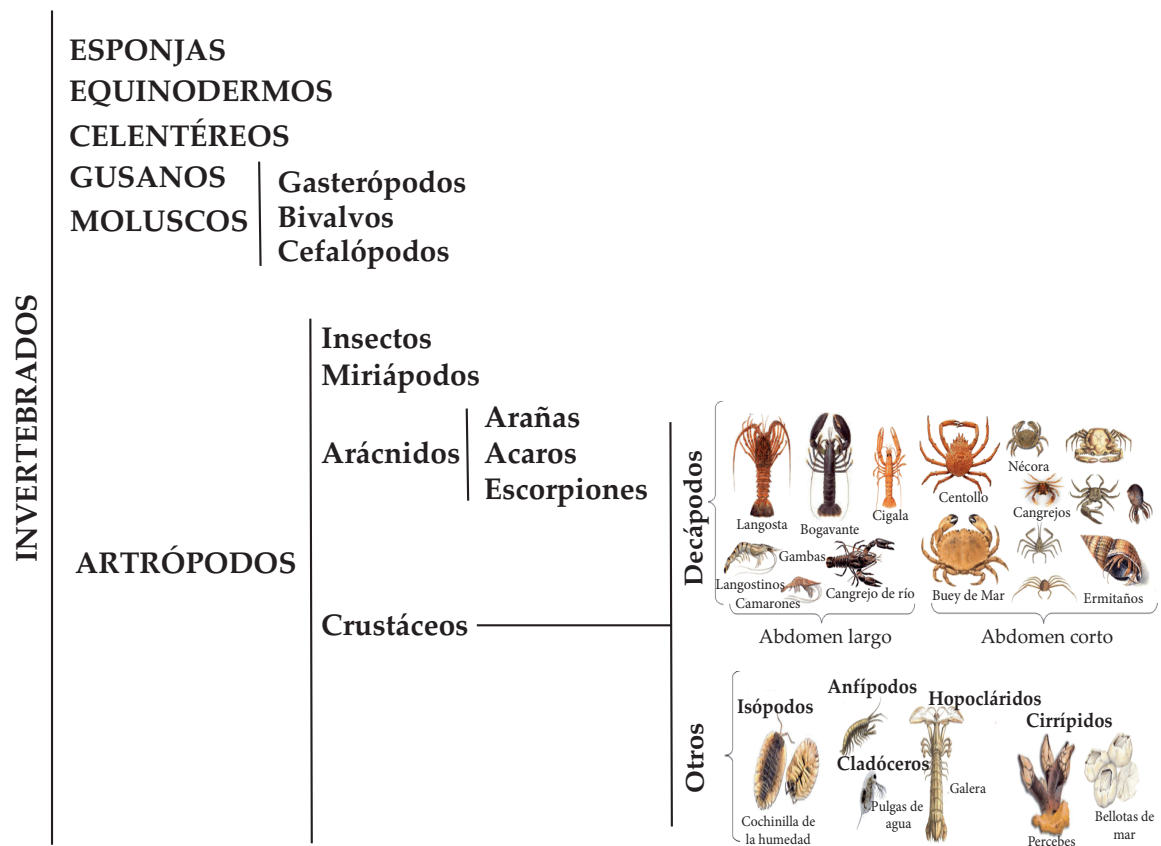


Figura 10. Clasificación general de los invertebrados.

Entre la alergia al marisco, la gamba es el mayor responsable de dicha alergia. Las gambas dentro del filo *Arthropoda* pertenecen al subfilo *Crustacea*, concretamente a la clase *Malacostraca*, subclase *Eumalacostraca* y orden *Decapoda*, existiendo numerosas familias y géneros con distintas especies responsables de esta alergia.

La gamba *Solenocera melanthera*, pertenece a la familia *Penaeidae*, al igual que las gambas extensamente estudiadas en alergia de los géneros *Penaeus*, *Metapenaeus* y *Litopenaeus*. Esta gamba, también denominada gamba roja del Pacífico, procede, como su nombre indica, del Pacífico y normalmente se consume pelada y congelada, lo que ha hecho que su comercialización se extienda ampliamente en todo el mundo.

A pesar de ser una de las gambas más consumidas en España, no existen estudios de la alergia a esta especie de gamba.

5.2. PREVALENCIA E INCIDENCIA DE LA ALERGIA AL MARISCO

España es y ha sido tradicionalmente un país productor y consumidor de alimentos de origen marino. Tanto el consumo, como la comercialización de alimentos de origen marino en nuestro país ha seguido la tendencia mundial y ha aumentado en las últimas décadas.

Según los datos aportados por el Ministerio de Pesca y Alimentación, en el 2011 en España, el consumo de pescado y marisco era de 26,8 Kg por habitante y por año; de

los cuales 7,5 Kg correspondían al consumo de mariscos, moluscos y crustáceos [140]. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de la alergia al marisco en nuestro país.

Respecto a la prevalencia exacta de la alergia al marisco no existen datos concretos, dado que en un lugar determinado dicha prevalencia está relacionada con la cantidad y la especie consumida en la dieta local. Además, las variaciones entre estudios se atribuyen a diferentes factores, como los parámetros elegidos para decidir si el individuo en cuestión es o no alérgico, las características clínicas de las cohortes estudiadas (edad, origen) y las características del alérgeno usado durante la provocación (naturaleza, procesado). Tales diferencias se ven reflejadas en la gran heterogeneidad de resultados publicados sobre la prevalencia de alergia al marisco [141-146].

Según el estudio epidemiológico Alergológica 2005 [15], los crustáceos son los responsables del 85,2% de las reacciones alérgicas al marisco, y del 18,7% de las reacciones alérgicas a alimentos. La alergia al marisco se ha descrito como la alergia alimentaria con mayor prevalencia en las Islas Canarias [147].

Además, cuando se comparan los datos del estudio epidemiológico Alergológica de 1992 con los del 2005, se observa que la frecuencia de la alergia al marisco es la única que ha aumentado en los últimos años (8% en 1992 *vs* 22% en 2005) (**Figura 3**).

La alergia al marisco es más frecuente entre individuos atópicos. Se empieza a manifestar en los primeros años de vida del individuo (0-2 años), pero es en la edad de adulto joven (16-30 años) cuando su prevalencia aumenta (**Figura 4**).

La vía habitual de sensibilización es la digestiva, por consumo directo de marisco, aunque los vapores de cocción y partículas de restos alimenticios de marisco en el ambiente pueden tener un papel importante en la sensibilización por inhalación [148, 149].

5.3. ALÉRGENOS DEL MARISCO

El marisco posee una composición rica en proteínas, de las cuales muchas son capaces de unir IgE del suero de los individuos alérgicos, sin embargo sólo algunas de ellas han sido identificadas hasta la fecha.

La primera proteína alergénica identificada en el marisco fue la **tropomiosina** (TM), siendo ésta la única proteína caracterizada como alérgeno mayoritario en el marisco.

Hoffman y cols. fueron los primeros en identificar y caracterizar parcialmente alérgenos de gamba. Estos autores aislaron el antígeno II de un extracto de gamba cocida, frente al cual el 100% de la población estudiada presentaba IgE específica frente a esta proteína. Este antígeno II era una glicoproteína termoestable de 38 kDa, con un punto isoeléctrico (pI) de 5,4-5,8, compuesta de 341 aminoácidos y un contenido de carbohidratos del 4%. Estos mismos autores también aislaron el antígeno I, pero de un extracto de gamba crudo, siendo éste una proteína ácida termolábil de 21 kDa, con un pI de 4,75-5, 189 aminoácidos y 0,5% de contenido de carbohidratos; siendo capaz de unir IgE en 7 de los 11 individuos estudiados [150].

Posteriormente Nagpal y cols. [134] identificaron dos proteínas alergénicas del extracto de la gamba cocida *Penaeus indicus*: Sa-II, de 34 kDa, con 301 aminoácidos y aparentemente similar al antígeno II identificado por Hoffman; y Sa-I, de 8,2 kDa,

termoestable y que no fue caracterizado. El antígeno Sa-II se identificó como TM de la gamba *P. indicus*, denominándose Pen i 1.

Daul y cols. identificaron la TM de la gamba marrón *P. aztecus*, Pen a 1, proteína muscular de 36 kDa, compuesta de 312 aminoácidos y 2,9% de carbohidratos [135].

Tanto el antígeno I, SA-II y Pen a 1, parecen ser la misma proteína dado que sus PMs, composición de aminoácidos y reactividad IgE son muy similares.

Estudios posteriores de alergia a diferentes mariscos han identificado esta proteína en diferentes especies de gambas y mariscos, demostrado que la TM es el alérgeno mayoritario responsable de la alergia al marisco [139, 151].

La TM es una proteína termorresistente, ácida y de una secuencia de 284-312 aminoácidos que comparte del 93-100% de secuencia proteica con otras TMs de gambas.

Los péptidos de unión a IgE del alérgeno Pen a 1 han sido aislados y caracterizados por Reese y cols. [152], localizándose tanto en la parte filogenéticamente variable, como en la conservada. A partir de la gamba *Metapenaeus ensis*, también ha sido posible caracterizar dos péptidos de unión a las células B-IgE específicos, correspondientes a las secuencias de aminoácidos 46-63 y 150-158; y un epítipo de unión a células T, péptido 4, correspondiente a la secuencia de aminoácidos 261-281 [153]. Ayuso y cols. [154] han descrito 7 epítopos IgE de la TM de la gamba *Litopenaeus vannamei*, correspondientes a las secuencias de aminoácidos que se indican en la **Tabla I**.

Tabla I. Epítopos IgE identificados en la tropomiosina. Ayuso y cols. [154].

| TM aa | Epítipo 1 | Epítipo 2 | Epítipo 3 | Epítipo 4 | Epítipo 5 | Epítipo 6 | Epítipo 7 |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---|-----------|-----------|
| | 1-36 | 37-63 | 61-81 | 82-105 | (a) 115-150 (b) 142-162 (c) 157-183 | 190-210 | 246-284 |

La TM se ha identificado en numerosas especies de invertebrados, no sólo en los artrópodos, sino también en moluscos como el pulpo [155], calamar [137], ostras [156], etc.; y también en nemátodos como *Anisakis simplex* o *Ascaris lumbricoides* [157-159], siendo uno de los panalérgenos más importantes dentro de los alérgenos de origen animal.

El segundo alérgeno identificado en el marisco es una proteína con actividad energética, la **arginin kinasa** (AK). Yu y cols. [160] identificaron, aislaron y clonaron la secuencia de 356 aminoácidos de este nuevo alérgeno de la gamba *Penaeus monodon* (Pen m 2) de 40 kDa y pI 6,0. Es una proteína abundante en el músculo de la gamba y muy similar a la de otros crustáceos: cigala (*Procambarus clarkii*) y langosta (*Homarus gammarus*), con una identidad de secuencia del 90%; y con el cangrejo (*Limulus polyphemus*) la homología es del 77%. En este trabajo, demuestran que la TM Pen m 1 es el alérgeno mayoritario de esta gamba, mientras que la AK parece ser importante como alérgeno para alguno de estos pacientes (27%).

Esta proteína se identificó por primera vez como alérgeno en la polilla *Plodia interpunctella* [161], demostrando además, mediante ensayos de inhibición, que esta proteína purificada era capaz de inhibir la unión de IgE a las proteínas de PM equivalente a la AK (40 kDa) de los extractos de ácaro, cucaracha, langostino, langosta y

mejillones; y definiéndolo por lo tanto como un nuevo panalérgeno en los invertebrados.

Además, esta proteína se ha identificado como alérgeno en otros crustáceos, tales como el cangrejo (*Charybdis feriatus* y *Portunus pelagicus*); en diferentes artrópodos como *Blatella germanica* (Bla g 9), *Periplaneta americana* (Per a 9), arañas (*Holocnemus pluchei*), mosquito (*Aedes aegypti*); en nemátodos como el gusano de seda (*Bombyx mori*) y en moluscos como el pulpo (*Octopus fangsiao*) [161-167].

La AK de los crustáceos se caracteriza por ser una proteína termolábil y volátil, propiedades que explican los elevados niveles detectados en los aerosoles de los cocederos de marisco. Por lo tanto, la AK es la responsable de la sensibilización de pacientes con asma ocupacional dentro de la industria marisquera [148].

Otra proteína identificada como alérgeno de la gamba *L. vanamei*, Lit v 3, es la **cadena ligera de la miosina** (*myosin light chain* (MLC)) [168]. Esta proteína pertenece a la súperfamilia de proteínas que se mueven a lo largo de los filamentos de actina mientras hidroliza adenosina triosa-fosfato. La miosina está formada por 2 cadenas pesadas, cada una de las cuales posee un dominio globular (“motor”) que interacciona con la actina, mientras que las colas de estas cadenas pesadas forman un dímero enrollado; y por 2 cadenas ligeras, cada una de 20 kDa enrolladas alrededor de cada cadena pesada de la miosina. Esta proteína ha sido descrita como alérgeno en otros crustáceos, como cangrejo (Cra c 5), langosta (Hom a 3); y cucarachas (Per a 8 y Bla g 8) [169]. En un estudio de un caso clínico se ha identificado la proteína MLC como alérgeno del pollo, siendo la primera vez que se describe una proteína de origen muscular como alérgeno de vertebrados [170].

Paralelamente a la identificación de la MLC como alérgeno, se identificó otro alérgeno en la gamba *P. monodon*, la **proteína sarcoplásmica de unión de calcio** (*sarcoplasmic calcium binding protein* (SCBP)), Pen m 4 [171]. También se ha identificado en la gamba *L. vannamei*, Lit v 4 [172] y cangrejo rojo de río (*P. clarkia*) [173].

Esta proteína de alrededor de 20 kDa y 193 aminoácidos, presenta una homología de secuencia del 80-100% entre las SCBPs de gambas y otros crustáceos [174]. La SCBP es una proteína termoestable [148] del tipo *EF-hand* [172] como las parvalbúminas. Son proteínas presentes en el músculo implicadas en el proceso de relajación de éste, y responsables de la unión del calcio [175]. Estas proteínas se caracterizan por una estructura de doble hélice unida por un *loop* (bucle), muy conservada que le permite al motivo *EF-hand* la unión covalente de 2 cationes divalentes, Ca²⁺ o Mg²⁺ [175-177]. Los sitios de unión al calcio resultan imprescindibles tanto para la estabilidad conformacional de la proteína, como para su alergenidad [178].

Los alérgenos **troponina C** (TnC) y **triosa fosfato isomerasa** (TFI) han sido recientemente identificados como alérgenos de la gamba *Crangon crangon* [179].

La TnC forma parte del complejo de troponina, el cual está formado por 3 subunidades: TnT, que se une a la TM; TnI, que cubre el punto activo de la actina, el cual interactúa con la miosina; y la TnC que tiene afinidad por el ión de calcio. Esta proteína, junto con la TM, están implicadas en la contracción muscular; de forma que cuando el

Ca²⁺ se fija a la TnC, se produce un cambio en la posición de la TM que descubre los sitios de la actina donde se va a fijar la parte globular de la miosina.

Esta proteína de 28 kDa, ha sido identificada como alérgeno en el nemátodo *A. simplex* [157], en la cucaracha *B. germanica*, Bla g 6 [180] y en el ácaro *Tyrophagus putrescentiae* [181], presentando una homología de secuencia entre los artrópodos del 62,7-85,5% [181].

La TFI es una enzima implicada en el metabolismo del mio-inositol, que ha sido identificada como alérgeno en diferentes especies vegetales, como látex [182], sandía [183] y harina de trigo [184]; al igual que en especies animales como en el mosquito *Forcipomyia taiwana* [185], en el salmón [186] y en el lenguado [187]; además de en la cucaracha *B. germanica* [188].

Recientemente se ha descrito otro nuevo alérgeno de la gamba en la especie de gamba gigante de agua dulce de PM alrededor de 60-80 kDa, identificándose como homólogo a la proteína **hemocianina** [189], la cual se ha descrito previamente como alérgeno de la cucaracha *P. americana* [190] y como potencial alérgeno del caracol (*Helix aspera* y *H. pomatia*) y del ácaro *D. pteronyssinus* [191].

5.4. TROPOMIOSINA COMO PANALÉRGENO

Como se ha mencionado anteriormente, la TM es el alérgeno mayoritario descrito en distintas especies de gambas, camarones, langostas y otros crustáceos [134-139, 192]. Es el panalérgeno responsable de la RC entre mariscos, insectos (cucarachas), arácnidos (ácaros) y otros parásitos [121, 155-159, 163, 164, 188, 193].

Las TMs comparten una homología de secuencia entre las diferentes especies de gambas del 93-99%, y entre otros artrópodos esta homología es del 75-80% [193], aunque en función de la especie pueden poseer diferentes epítomos IgE [154]. Recientemente, se ha demostrado la existencia de RC entre las TMs de las gambas *S. melantho* y *P. monodon* con la del ácaro *D. pteronyssinus* [194].

Aunque la mayoría de los aminoácidos de la TM están conservados, algunos segmentos de su secuencia difieren lo suficiente entre vertebrados e invertebrados, y esto explicaría porqué las TMs de los vertebrados no son capaces de inducir respuesta de IgE [195].

Hasta la fecha no se han identificado otros alérgenos responsables de la RC entre el marisco y otros artrópodos.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es la caracterización de las principales proteínas implicadas en las reacciones alérgicas a gamba, identificando nuevos alérgenos de la gamba *Solenocera melanthero*, así como el estudio de su implicación en la reactividad cruzada con el ácaro del polvo *Dermatophagoides pteronyssinus*; y la obtención de un extracto de gamba hipoalergénico que permita mejorar el tratamiento de la alergia a gamba en concreto y de otros mariscos en general.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterización demográfica y clínica de los pacientes alérgicos a gamba de dos poblaciones de localización geográfica y clima distintos.
2. Caracterización e identificación de los principales alérgenos de la gamba *S. melanthero*.
3. Estudio de la reactividad cruzada entre la gamba *S. melanthero* y el ácaro *D. pteronyssinus* respecto a los principales alérgenos identificados en la gamba *S. melanthero*.
4. Obtención de un extracto de gamba hipoalergénico.
5. Estudio de la actividad alérgica del extracto de gamba hipoalergénico mediante pruebas *in vivo* y *ex vivo*, además del estudio de su capacidad inmunogénica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. SUJETOS DE ESTUDIO

Los sujetos de estudio fueron reclutados entre los pacientes que acudían a los Servicios de Alergología de los hospitales de Madrid Fundación Jiménez Díaz-IDC y Hospital Niño Jesús; y del Hospital General de Calde de Lugo.

El criterio de selección para ser incluido o no en el estudio fue haber presentado síntomas tras la ingesta de marisco, lo cual era indicativo de posible alergia a dicha fuente alergénica. Así los individuos se clasifican en:

- **Individuos control**, reclutados de forma voluntaria entre el personal de investigación del IIS-Fundación Jiménez Díaz. Todos ellos eran individuos sin historial de enfermedades alérgicas y que además presentaban pruebas cutáneas negativas frente a la batería de neumalérgenos habituales (pólenes, epitelios de animales, hongos ambientales y ácaros).

- **Individuos con síntomas sugestivos de alergia a marisco**, entre estos, los procedentes de los hospitales de Madrid presentaban reacciones inmediatas tras la ingesta de marisco. En este grupo había sujetos que además presentaban síntomas frente a los ácaros, al igual que ocurría entre los individuos de Lugo con síntomas sugestivos de alergia a marisco.

- **Individuos con síntomas respiratorios sensibilizados a ácaro**, procedentes de los hospitales de Madrid y Lugo, los cuales presentan rinitis y/o asma exclusivamente.

2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

La obtención de muestras se realizó tras la firma del consentimiento informado por parte de los pacientes e individuos control, previa aprobación del proyecto por el Comité Ético de cada hospital.

A todos los individuos del estudio se les extrajo un tubo de sangre con gelosa y sin anticoagulante (Vacutainer SSTØBD S.A., Madrid, España). El suero obtenido se recogió y se hicieron alícuotas en tubos Eppendorf® (Eppendorf Ibérica, Madrid, España) para ser almacenados a -20°C hasta su posterior uso. Cada suero se designó con un código numérico, evaluando así los resultados en ciego. Este código numérico se reveló en el momento de analizar los datos obtenidos.

A algunos de estos individuos se les extrajeron tubos de sangre adicionales con anticoagulante: dos tubos de sangre completa con ácido etilendiamino tetracético (EDTA) para la purificación de células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs); y otro tubo con heparina (Vacutainer SSTØBD S.A., Madrid, España) para los ensayos de activación de basófilos.

3. PRUEBAS CUTÁNEAS

Los individuos se sometieron a pruebas cutáneas de tipo SPT con la batería estándar de neumolárgenos y de alimentos (Leti SA, Madrid, España y/o ALK-Abelló, Madrid, España), así como pruebas cutáneas de tipo SPPT con la gamba cruda (*S. melantho*). Estas pruebas se realizaron también con diferentes extractos de la gamba *S. melantho* (extracto cocido digerido y sin digerir) y fluido gástrico simulado con pepsina en 5 pacientes sensibilizados a gamba que dieron su consentimiento

Para determinar la sensibilidad de la piel, se utilizó histamina (10 mg/mL) como control positivo, y suero salino con glicerol como control negativo.

Las pruebas cutáneas se realizaron, siguiendo las recomendaciones internacionales [196], en la cara anterior del antebrazo, utilizando para cada alérgeno una lanceta estéril de punta de 1 mm ALK-Abelló (Madrid, España). Transcurridos 15 min de la prueba, se midieron el diámetro mayor y perpendicular de las pápulas, considerándose pruebas positivas las que provocaban pápulas cuyo diámetro era igual o superior a 3 mm.

Para que la positividad de esta prueba se tenga en cuenta, los individuos debían retirar todo medicamento que pudiese influir en dicha prueba (antihistamínicos y corticoides tópicos en la zona), además de no presentar ningún trastorno cutáneo en la zona de aplicación (eccema o urticaria facticia) [197].

4. DETERMINACIÓN DE LA IgE ESPECÍFICA

La determinación de IgE específica se realizó en un analizador de fluoroinmunoensayo, ImmunoCAP 250® (ThermoFisher, Uppsala, Suecia).

Se cuantificó la IgE específica a *D. pteronyssinus* y a *P. aztecus* en los sueros procedentes de los individuos de Madrid. Asimismo, se midió la IgE específica a la TM recombinante de esta especie de gamba (rPen a 1).

La cuantificación de la IgE específica para cada alérgeno se realizó según las indicaciones de la casa comercial. Los resultados obtenidos se leyeron automáticamente en un analizador y los datos se almacenaron en la aplicación UDM (ThermoFisher, Uppsala, Suecia) para su posterior análisis. En función del valor de IgE obtenido, el sistema de ThermoFisher define siete clases cuantitativas que sirven para clasificar a los pacientes: clase 0, por debajo de 0,35 kUA/L; clase 1, de 0,35 a 0,7 kUA/L; clase 2, de 0,7 a 3,5 kUA/L; clase 3, de 3,5 a 17,5 kUA/L; clase 4, de 17,5 a 50 kUA/L; clase 5, de 50 a 100 kUA/L; clase 6, por encima de 100 kUA/L.

5. PROVOCACIÓN ORAL DOBLE CIEGO CONTROLADA CON PLACEBO

Para la realización de la PODCCP se siguió la metodología habitual recomendada por la EAACI [63].

Las provocaciones se ejecutaron en el servicio de alergia de los hospitales de Madrid, Fundación Jiménez Díaz y Niño Jesús, en los cuales se dispone de los equipos necesarios de reanimación para el control y tratamiento de posibles reacciones graves (incluido adrenalina y oxígeno, así como resucitación cardio-pulmonar). Todas las provocaciones fueron supervisadas por enfermeras y alergólogos de forma ciega.

Se realizó la provocación oral en todos los pacientes de Madrid, a excepción de, los pacientes que confirmaban tolerar la ingesta de gamba en los 3 meses previos al estudio; y los pacientes en los cuales no estaba indicado la realización de dicha prueba debido a la gravedad de su sintomatología.

Antes de realizar una provocación oral se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- El paciente no debía presentar ninguna enfermedad concomitante (infecciones respiratorias, rinitis alérgica, fiebre, etc.), además de estar asintomático desde el punto de vista alérgico o con la mínima sintomatología posible en los casos de dermatitis atópica. En pacientes asmáticos se realizó en fase estable (ausencia de reagudizaciones en el último mes).
- Se suspendió la medicación que pudiese enmascarar, atrasar, aumentar o evitar las reacciones alérgicas o interferir en el tratamiento de las reacciones (antihistamínicos, neurolépticos, esteroides orales (más de 5 mg/día), anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) y beta-bloqueantes.

Las pruebas de provocación se llevaron a cabo en el hospital de forma ambulatoria, comenzando a las 9 de la mañana y con observación de, al menos, 2 horas después de la última dosis.

Al iniciar la provocación, es decir, la administración de dosis crecientes de la papilla placebo o la papilla activa, los pacientes estaban en ayunas. Estas papillas consistían en un batido de helado de vainilla y chocolate preparado por los dietistas de los hospitales, siendo la papilla activa la que contenía la gamba *S. melantho*. Ninguno de los sujetos sometidos a la provocación oral era intolerante a la lactosa o alérgico a alguno de los compuestos de la papilla.

Las provocaciones se realizaron de forma aleatoria, considerándose positivas si los pacientes presentaban los mismos síntomas frente a tres dosis consecutivas.

En caso de que la PODCCP fuese negativa, los pacientes se sometieron a una POA, administrándoles hasta un total de 12 gambas cocidas.

Cuando aparecía una reacción adversa durante la provocación, la prueba se detuvo, y el paciente recibió el tratamiento correspondiente en función de la clínica que presentaba en cada caso, manteniéndose en observación el tiempo necesario hasta su completa recuperación. En caso de reacciones graves, se dejó al paciente en observación hospitalaria durante varias horas.

6. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS DE LA GAMBA *Solenocera melanto*: CRUDO, COCIDO Y LÍQUIDO DE COCCIÓN

Con el fin de obtener el extracto proteico de la gamba *S. melantho* se procedió a realizar la extracción de las proteínas solubles de dicha gamba.

Para ello se procesó la gamba cruda congelada, previamente descongelada, en PBS según la proporción peso/volumen (p/v) (1/10), mediante un homogeneizador MICCRA D-1 (ART Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG, Müllheim-Hügelheim, Alemania), realizando 5 ciclos de 10 s/ciclo. El homogeneizado obtenido se dejó en agitación a 4°C durante toda la noche para la extracción de las proteínas solubles.

Posteriormente se eliminaron los restos celulares y tisulares mediante centrifugación a 12000 g durante 20 min en la Centrífuga Beckman J2-21M/E (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA) y se recogió el sobrenadante (SBN) que contenía las proteínas solubles.

También se obtuvieron dos extractos de la gamba *S. melantho* tratados con calor: extracto de gamba cocida y líquido de cocción. Para ello, la gamba troceada se calentó a 60°C en PBS (proporción 1/3, p/v) durante 15 min y posteriormente mediante una membrana de nylon (BD Falcon, Bélgica) se obtuvo un filtrado, el cual corresponde al extracto de líquido de cocción. Los restos de la gamba cocida se disolvieron en PBS (proporción 1/5, p/v) y posteriormente se procedió a la extracción de las proteínas solubles de igual modo que como se hizo con el extracto de la gamba cruda.

Los extractos dializados frente a H₂O_d fueron filtrados a través de una membrana de 0,22 µm (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) y se congelaron a -80°C para posteriormente ser liofilizados en el liofilizador TELSTAR Cryodos (TELSTAR, Terrasa, España).

La concentración de proteínas de los extractos liofilizados y disueltos en PBS se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford (1976) [198], utilizando el kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA). Para obtener los valores de concentración a partir de la densidad óptica (DO) medida a 590 nm (DO₅₉₀), se realizó una curva patrón con los valores de DO₅₉₀ obtenidos a partir de concentraciones crecientes de albumina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, MA, EUA).

7. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES SDS-PAGE

La separación de proteínas en función de su tamaño se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), según el método de Laemmli [199].

Esta separación se llevó a cabo en geles discontinuos, compuestos por un gel superior (concentrador) preparado al 3% de acrilamida/bisacrilamida (Protogel Nationaldiagnostics, Hessle Hull, Reino Unido) y pH 6,8; y un gel inferior (separador) al 12,5-20% de acrilamida/bisacrilamida y pH 8,8. Los porcentajes de acrilamida se eligieron en función del tamaño de las proteínas a separar.

Las muestras sometidas a electroforesis se prepararon añadiéndoles tampón de

carga (SB5X: Tris-HCl 100 mM pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2% y glicerol 20%) e incubándolas 5 min a 95°C para su completa desnaturalización.

En el gel, además de las muestras, también se cargaron unos marcadores preteñidos de proteínas de PM conocido (Prestained SDS-PAGE Standard, Bio-Rad, Richmond, CA, EUA).

Tanto las muestras como los marcadores se sometieron a una corriente de 100-150 V, empleando la cubeta del sistema Mini Protean II (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA).

Los geles sometidos a electroforesis se fijaron y se tiñeron para la visualización de las proteínas; o bien se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para realizar las inmunodetecciones.

7.1. TINCIÓN AZUL COOMASSIE COLOIDAL

Para visualizar las proteínas en los geles SDS-PAGE, estos se fijaron con una solución de etanol 50% y ácido orto-fosfórico 2% durante 1 h, después se lavaron 3 veces con H₂O_a durante 10 min cada lavado, y por último se sumergieron en una solución de tinción de azul coomassie coloidal G-250 al 33% (Sigma-Aldrich, MA, EUA) durante toda la noche. Para una correcta visualización de las bandas proteicas, se realizaron lavados con H₂O_a hasta que estas se diferenciaron bien con respecto al fondo del gel.

7.2. ELECTROTRANSFERENCIA

Las proteínas separadas en los geles SDS-PAGE pueden ser utilizadas para las inmunodetecciones, pero para ello es necesario ser transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA).

Previamente, los geles y las membranas de nitrocelulosa se sumergían en el tampón de transferencia (Glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 1,3 mM y metanol 20%) durante 15 min. Los papeles de filtro (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA), también se humedecían en este mismo tampón, y a continuación se preparaba el *sandwich* de papel de filtro, membrana, gel, papel de filtro.

La transferencia de las proteínas del gel a la membrana se llevó a cabo mediante transferencia semi-seca en un Trans-Blot® Turbo Transfer System (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA) a 15 V durante 17 min.

Finalizada la transferencia, las membranas se tiñeron con una solución Rojo Ponceau (Sigma-Aldrich, MA, EUA) para visualizar las proteínas y determinar la eficacia de la transferencia, destiñéndose después con H₂O_a.

Seguidamente, las membranas se sumergieron en una solución de bloqueo (Net 1X (Tris 5 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 0,05% a pH 7,5) y gelatina 0,25%) durante 2 h a temperatura ambiente (TA) y en agitación, como paso previo a la inmunodetección de las proteínas transferidas.

8. INMUNODETECCIÓN

8.1. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS SEPARADAS POR SDS-PAGE

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas y bloqueados los sitios inespecíficos, se incubaron con el anticuerpo (Ac) primario, pudiendo ser éste un suero de conejo anti-proteínas de la gamba *S. melantho*, o bien los sueros de pacientes y sujetos control de forma individual o en *pool*.

La dilución y el tiempo de incubación de los Acs primarios dependía del tipo de Ac (**Tabla II**); así, si se trataba de sueros humanos, éstos se incubaron diluidos 1:3 durante toda la noche a 4°C en agitación orbital; y si el suero empleado era de conejo, la incubación se realizó durante 1 h a TA en agitación y diluido 1:5000.

Tabla II. Condiciones experimentales de las inmunodetecciones.

| Ac 1 ^{ario} | Dilución | Tiempo/T ^a | Ac 2 ^{ario} / SAV-HRP | Dilución | Tiempo/T ^a |
|-----------------------|----------|-----------------------|-----------------------------------|----------|-----------------------|
| Sueros humanos | 1/3 | t.n./4°C | Anti-IgE humana | 1/100000 | 1 h/TA |
| Sueros conejos | 1/5000 | 1 h/TA | Anti-IgG de conejo | 1/10000 | 1 h/TA |
| | | | SAV-HRP | 1/100000 | 30 min/TA |

SAV-HRP: estreptavidina peroxidasa; T^a: temperatura; t.n.: toda la noche; TA: temperatura ambiente.

Las membranas incubadas con los sueros humanos, se cortaron previamente en tiras para poder realizar las inmunodetecciones de forma individualizada.

Como Ac secundario para la inmunodetección se usó un Ac de conejo anti-IgE humana unido a biotina (INGENASA, Madrid, España) diluido 1:100000, que se incubó durante 1 h a TA, seguido de estreptavidina (SAV) conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (BD, Franklin Lakes, NJ New Jersey, EUA) diluida 1:100000 durante 30 min a TA (**Tabla II**). Además, como control inespecífico de la técnica, una de las tiras no se incubó con Ac primario.

Para las inmunodetecciones en las cuales se usó el suero de conejo, el Ac secundario empleado fue un anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (anti-IgG-HRP) producido en cabra (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) diluido 1:10000, siendo el tiempo de incubación de 1 h a TA (**Tabla II**).

Como diluyente para todos los Acs se usó la solución de bloqueo. Entre las incubaciones con cada uno de estos Acs, tanto primarios como secundarios, o con la SAV-HRP, se realizaron lavados cada 10 min durante 1-2 h con solución Net 1X.

La detección de las proteínas a las cuales se unían los Acs se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia. Para ello se añadió el reactivo ECL[®] (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 1 min y las membranas se dispusieron en el dispositivo de revelado (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) junto con la placa fotográfica (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare,

Chalfont St. Giles, Reino Unido). El tiempo de exposición de la placa fotográfica antes de ser revelada, dependía de la intensidad deseada de la inmunodetección.

8.2. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE *DOT-BLOT*

En esta técnica las proteínas se fijan directamente en la membrana de nitrocelulosa, con lo cual las proteínas no están desnaturalizadas. Para ello se usa una membrana cuadrículada de nitrocelulosa, donde se deposita una determinada cantidad de proteína en un volumen pequeño (0,5-5 μ L) y se deja secar para luego pasar a bloquear los sitios inespecíficos de la membrana y seguir con el proceso de inmunodetección descrito anteriormente (apartado 8.1).

9. IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS PROTEÍNAS ALERGÉNICAS DE LA GAMBA *Solenocera melantho*

9.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las proteínas del extracto de la gamba *S. melantho* y del ácaro *D. pteronyssinus* se separaron mediante electroforesis en un gel de acrilamida grande, el cual permitió cargar mayor cantidad de extracto proteico. La electroforesis se realizó en la cubeta Protean Dual Vertical Slab Gel Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA) a 25 mA por gel a 4°C durante 8 h. A continuación el gel se tiñó con azul coomassie coloidal y mediante un escalpelo estéril se escindieron las bandas de interés del gel y se guardaron en tubos eppendorf® estériles para su posterior análisis. Todos los pasos anteriores se hicieron extremando las condiciones de limpieza para no contaminar las muestras con queratinas u otras proteínas.

El análisis de espectrometría de masas (MS) se realizó en la Unidad de Proteómica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Las muestras se lavaron con H₂O_{bd}, se secaron y se sometieron a una digestión con tripsina según el protocolo descrito por Shevchenko y cols. [200]. Los péptidos de las proteínas digeridas fueron purificados según el método detallado por Gobom y cols. [201] mediante un espectrómetro de masas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of fly*) Voyager DE-STR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Con el fin de identificar las proteínas, se realizó una búsqueda en la base de datos no redundante de secuencias proteicas (NCBI) utilizando el buscador MASCOT, de la compañía Matrixscience Ltd (<http://www.matrixscience.com>), y se aplicaron los siguientes parámetros de búsqueda:

- precisión de masa < 50 ppm. Éste es el error permitido en la asignación de masas peptídicas, es decir, el rango de medida que se considera aceptable para ser identificada positivamente como la masa de un péptido concreto.
- modificaciones fijas: carbamidometilación de los residuos de cisteína. Esta modificación post-transduccional se tuvo en cuenta siempre al calcular la

masa de los residuos.

- modificaciones variables: oxidación de la metionina. Estas modificaciones se tuvieron en cuenta en todas sus posibles combinaciones (así, en el caso de que el péptido contenga tres metioninas, el servidor considerará todas las posibles combinaciones de 1, 2 ó 3 metioninas oxidadas).

Como criterios necesarios para asignar una identificación inequívoca a cada una de las proteínas analizadas se establecieron los siguientes criterios:

- probabilidad asociada a la búsqueda (*Score* de *Mowse*: $-10 \times \log(P)$, $P < 0,05$),
- correspondencia con las masas de péptidos resultantes de digestiones teóricas de proteínas en las bases de datos (*peptides matched*) ≥ 5 ,
- porcentaje de secuencia de la proteína candidata cubierta por los péptidos identificados (*sequence coverage*) $\geq 20\%$.

Para aquellas proteínas cuya identificación no fue posible por MALDI-TOF, se realizó un análisis de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), en un espectrómetro de masas 4700 Proteomics Analyzer con TOF/TOF™, con fuente de ionización tipo MALDI y dos analizadores tipo tiempo de vuelo en tándem y cámara de colisión (CID) para fragmentación de iones (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Así se obtuvieron secuencias peptídicas deducidas *de novo* a partir de los espectros MS/MS y se buscaron proteínas homólogas utilizando el programa de búsqueda BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

9.2. INMUNODETECCIÓN DE LAS NUEVAS PROTEÍNAS

Las nuevas proteínas identificadas en el extracto de la gamba *S. melantho* y utilizadas para estos ensayos de inmunodetección fueron: α -actinina de molleja de pollo, β -actina de músculo bovino, aldolasa de músculo de conejo y ubiquitina de eritrocitos de origen bovino (SIGMA, Saint Louis, Missouri, EUA). Se procedió como se indica en el apartado 8 del presente capítulo.

10. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA INMUNODETECCIÓN

Se realizaron diferentes inhibiciones de las inmunodetecciones de los extractos de la gamba *S. melantho*, del ácaro *D. pteronyssinus* (Leti SA, Madrid, España), así como de las TMs purificadas: natural de la gamba *P. monodom*, nPen m 1, y la recombinante del ácaro *D. pteronyssinus*, rDer p 10 (Bial, Bilbao, España). La membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se cortó en tiras, siendo posteriormente incubadas con diferentes *pools* de sueros, los cuales fueron previamente incubados con cantidades crecientes del extracto o proteína inhibidora, según las condiciones de cada ensayo (Tabla III).

Tabla III. Condiciones experimentales de los ensayos de inhibición

| <i>Pools</i> de sueros | Madrid (2,7,14,16) | Madrid (2,5,7) | Lugo (1,7) | Lugo (23,24) |
|----------------------------------|--|--|--|--|
| Extracto/proteína inhibidor/a | Gamba nPen m 1 rDer p 10 (1-100 µg) | Gamba (10-500 µg) Ácaro (20-200 µg) | Gamba (10-500 µg) Ácaro (20-200 µg) | Gamba (10-500 µg) Ácaro (20-200 µg) |

Pool de sueros de individuos seleccionados (números) procedentes de diferentes grupos de pacientes. Entre paréntesis se indica la cantidad (µg) empleada de cada extracto o proteína inhibidor para estos ensayos de inhibición.

Tanto en los ensayos de inhibición con las TMs, como con los extractos completos de gamba y ácaro, una de las tiras de la membrana de nitrocelulosa se incubó con el *pool* de sueros sin inhibir como control negativo de la inhibición. Además, una de las tiras se puso en contacto con el *pool* de sueros que había sido previamente incubado con BSA como extracto inhibidor, para comprobar que la inhibición no se debía a un efecto competitivo de la proteína.

Como controles negativos de la inmunodetección se usaron el suero de un individuo no atópico y el control inespecífico de la técnica (sin Ac primario).

11. PURIFICACIÓN DE LA TROPOMIOSINA DEL EXTRACTO DE LA GAMBA *Solenocera melantho*

La purificación de la TM de la gamba *S. melantho* se realizó mediante diferentes precipitaciones basadas en la solubilidad y en el pI de las proteínas. Para ello se siguió el protocolo empleado por Kunimoto y cols. [202] con algunas modificaciones.

11.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE LA GAMBA *Solenocera melantho*

Con el fin de obtener un extracto proteico de *S. melantho* sin proteínas sarcoplásmicas, la gamba se troceó y se le añadió tampón de extracción A (KCl 50 mM, NaHCO₃ 2 mM, 2β-mercaptoetanol (2ME) 10 mM, pH 8,0) según la proporción 1/2, p/v. Seguidamente se procesó la gamba mediante el homogeneizador MICCRA D-1 (ART Prozess & Labortechnik GmbH & Co. KG, Müllheim-Hügelheim, Alemania), realizando 5 ciclos de 30 s cada uno. A continuación se centrifugó la muestra a 12000 g durante 20 min a 4°C en la Centrifuga Beckman J2-21M/E (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). El precipitado que se obtuvo se disolvió en el tampón de extracción A (1/2, p/v) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Este proceso se repitió en total 3 veces.

Al precipitado conseguido tras la última centrifugación se le añadió etanol al 99,5% (p/v, 1/2) y la suspensión obtenida se filtró mediante una membrana de nylon de 40 µm (BD Falcon, Bélgica). El precipitado se lavó con etanol al 100% (1/4, p/v)

añadiéndolo directamente sobre la membrana. Por último se le añadió éter dietílico (1/2, p/v) y se dejó secando durante toda la noche a TA en una campana extractora.

Tras este proceso se obtuvo un polvo blanquecino que se disolvió en 2 volúmenes de tampón de re-extracción B (Tris-HCl 20 mM, KCl 1 M, 2ME 10 mM, pH 7,5) dejándolo en agitación durante toda la noche a 4°C. Se centrifugó a 12000 g durante 20 min a 4°C, descartándose el precipitado con los restos celulares y las proteínas sarcoplásmicas. El SBN de esta centrifugación, que contiene las proteínas miofibrilares, se utilizó en el siguiente paso de la purificación.

11.2. PRECIPITACIÓN ISOELÉCTRICA

A partir del SBN obtenido en el paso anterior, se llevó a cabo la precipitación isoeléctrica de la TM de la gamba *S. melantho*. Para ello se ajustó el pH del SBN a pH 4,5 con HCl 1 M, dejándolo 1 h a TA sin agitar y después se centrifugó en las mismas condiciones que las centrifugaciones anteriores. El precipitado se disolvió en 2 volúmenes de NaHCO₃ 1 mM y el pH se ajustó a 7,5 con KOH 1 M. La muestra se dejó así 1 h a TA sin agitar y después se volvió a centrifugar. Al SBN se le añadió 2ME y KCl para obtener una concentración final de 10 mM y 1 M, respectivamente. Los pasos de la precipitación isoeléctrica se repitieron 3 veces.

11.3. PRECIPITACIÓN CON SULFATO AMÓNICO

Para llevar a cabo la precipitación de la TM con (NH₄)₂SO₄ se añadió el volumen necesario de una solución saturada al 100% de (NH₄)₂SO₄ hasta alcanzar una concentración final del 50% en la mezcla de proteínas que contiene la TM. La mezcla se guardó a 4°C toda la noche, se centrifugó a 10000 rpm/15 min/4°C y el precipitado obtenido se disolvió en NaHCO₃ 1 mM.

Para finalizar todo el proceso de purificación de la TM, la solución obtenida se dializó frente a NaHCO₃ 1 mM y se liofilizó.

12. DIGESTIÓN GÁSTRICA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS Y LA TROPOMIOSINA PURIFICADA DE LA GAMBA *Solenocera melantho*

Con el fin de determinar la susceptibilidad de la TM purificada (TMP) y de las proteínas del extracto de la gamba *S. melantho* crudo y/o cocido a la digestión gástrica, se realizaron digestiones *in vitro* con pepsina.

Para ello se preparó un fluido gástrico simulado (FGS) (NaCl 0,2% (p/v), HCl 0,7% (v/v), pH 1,2) el cual no contenía pepsina, dado que ésta se añadió posteriormente al FGS según las condiciones de cada experimento (**Tabla IV**).

Tabla IV. Condiciones experimentales de los ensayos de digestibilidad de la TMP o los extractos de gamba.

| Ratio | 0,1 U/μg | 1 U/μg | 10 U/μg | C | C T ^a | C pH |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|---|--|------------|
| Proteína | 500 μg | 500 μg | 500 μg | 500 μg | 500 μg | 500 μg |
| FGS/ H ₂ O _d | 1mL FGS | 1mL FGS | 1mL FGS | 1mL H ₂ O _d (4°C) | 1mL H ₂ O _d (37°C) | 1mL FGS |

Ratios: unidades de pepsina/μg de proteína; **Proteína:** cantidad de proteína digerida; **FGS/H₂O_d:** volumen de fluido gástrico simulado o de H₂O_d de la reacción.

Se utilizó pepsina de mucosa gástrica porcina (3200-4500 U/mg pepsina) (SIGMA, Saint Louis, Missouri, EUA) diluida en FGS a la concentración de 10 mg/mL (FGS+P).

Antes de añadir la TMP o los extractos proteicos a 1 mL de FGS+P, éste previamente se calentó a 37°C durante 15 min. La digestión simulada se realizó a 37°C en agitación (900 rpm).

Para determinar el ratio óptimo y conseguir una digestión completa de las proteínas se realizó una curva de cantidad de pepsina por μg de proteína a digerir (U/μg) (**Tabla IV**).

Con el fin de comprobar si el pH extremo 1,2 y la temperatura de 37°C de las condiciones experimentales afectaban a la degradación de las proteínas, se prepararon controles (C pH y C T^a, respectivamente) según se indica en la **Tabla IV**.

Además se hizo una curva de tiempo de las digestiones tomando alícuotas a distintos intervalos (10 s, 5, 30 y 60 min). Dado que la pepsina se inactiva a pH 8, a estas alícuotas se les añadió tampón Tris 1 M que aumentaba el pH, parando así la digestión.

Las muestras obtenidas según las diferentes condiciones de las digestiones realizadas, se procesaron en geles SDS-PAGE; y la reactividad IgE de las proteínas digeridas se estudió mediante inmunodetección.

13. OBTENCIÓN DE SUEROS DE CONEJO ANTI-GAMBA COCIDA Y ANTI-GAMBA COCIDA DIGERIDA

Con el fin de obtener Acs frente a las proteínas de los extractos de la gamba *S. melantho* cocida y gamba cocida digerida con 10 U de pepsina/μg durante 60 min (SMCo y SMCoD₆₀, respectivamente), se inmunizaron dos conejos macho de alrededor de 3 kg (Granja cunicola San Bernardo S.L., Navarra, España).

La inmunización se llevó a cabo durante 4 semanas (1 dosis/semana), siendo las tres primeras dosis de 600 µg y la última de 800 µg de proteína. La primera dosis se administró junto al adyuvante completo de Freund (SIGMA, Saint Louis, Missouri, EUA) y las posteriores con el adyuvante incompleto de Freund (SIGMA, Saint Louis, Missouri, EUA). Las muestras a inyectar se administraron de forma intramuscular. Transcurrida una semana de la última dosis administrada, se realizó la extracción de sangre de la vena marginal de la oreja del conejo. A partir de la sangre extraída se obtuvo el suero mediante centrifugación a 3000 g durante 15 min a 4°C.

Con la intención de obtener suero control pre-inmune de estos conejos (pre-inm), antes de iniciar la inmunización, se les realizó una extracción de sangre, para la cual se procedió de igual modo que el arriba indicado.

El esquema de la inmunización y sangrado de los conejos se muestra en la **Figura 11**.

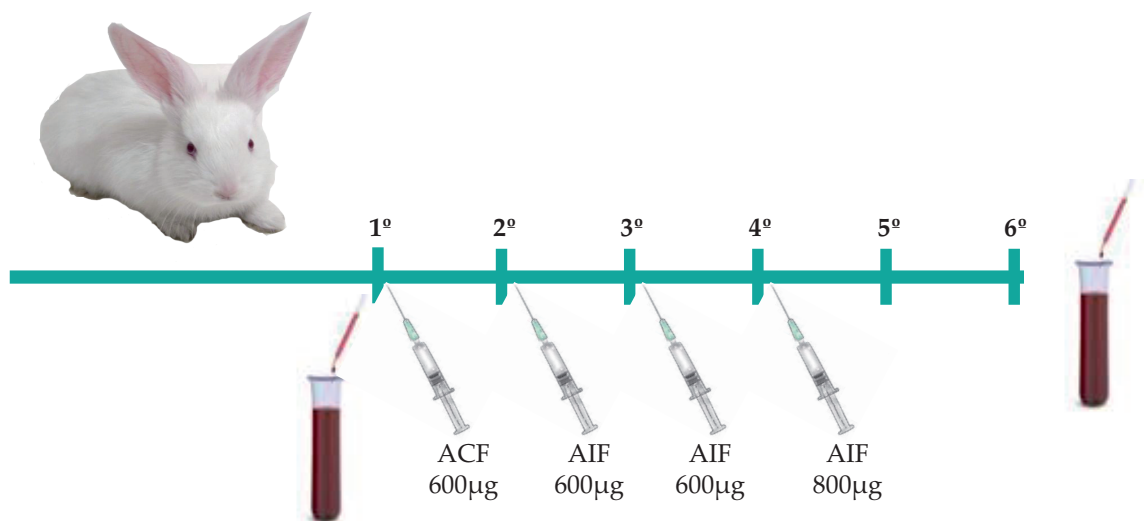


Figura 11. Esquema de inmunización y obtención de suero de conejos. Se realizó un sangrado inicial para obtener el suero pre-inmune de cada conejo. La inmunización consistió en administrar durante cuatro semanas los extractos de gamba cocida o cocida y digerida (1ª, 2ª y 3ª semana dosis de 600 µg; y 4ª semana 800 µg de proteína). La primera dosis se administró junto con el adyuvante completo de Freund (ACF) y las restantes con el adyuvante incompleto de Freund (AIF). El sangrado final de los conejos se realizó en la 6ª semana tras el inicio de la inmunización.

14. ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA)

Estos ensayos se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones del kit BD Opt EIA (BD Falcon, Bélgica).

Para ello se utilizaron placas Costar (Corning Incorporated, NY, EUA) de poliestireno de 96 pocillos y alta capacidad de unión, las cuales se tapizaron con 5 µg de extracto diluido en 100 µL de tampón carbonato/bicarbonato 0,1 M y pH 9,5 durante toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween-20® al 0,05% (PBST). Tras los lavados, los sitios de unión inespecíficos de las placas se bloquearon con 200 µL de la solución de suero de ternera fetal inactivado

(STFi) al 10% (p/v) en PBS durante 1 h. Los Acs primarios y secundarios empleados, así como los tiempos de incubación, varían en función del tipo de ELISA. Todos los sueros y Acs secundarios se diluyeron en la solución de bloqueo. Tras la incubación con cada uno de los Acs se realizaron lavados con PBST.

Finalmente, el ensayo se reveló con el reactivo tetrametilbenzidina (TMB), parando la reacción con H_2SO_4 2 N y midiendo la absorbancia a 450 nm con un filtro de referencia a 570 nm en el lector automático de microplacas (TECAN, Männedorf, Suiza).

Todos los puntos de los ensayos se realizaron por duplicado, incluido el blanco de la técnica, en el cual no se había añadido Ac primario.

14.1. ELISA DE TITULACIÓN DE LOS ANTICUERPOS DE LOS SUEROS DE LOS CONEJOS

Se realizaron ELISAs indirectos con el extracto de gamba cocida y los sueros de los conejos inmunizados y pre-inmunes (**Figura 12**).

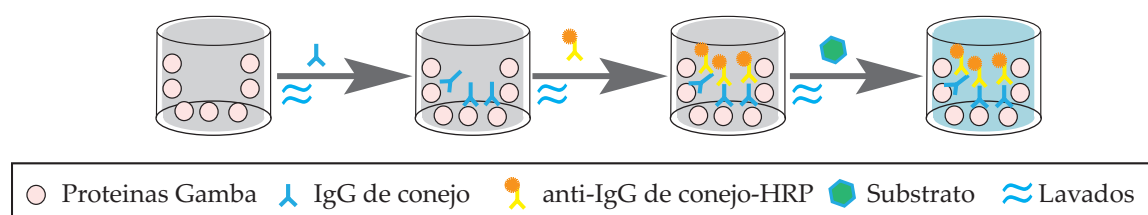


Figura 12. ELISA de titulación: Placa de ELISA tapizada con proteínas del extracto de gamba; lavados y adición del suero de los conejos inmunizados o pre-inmunes (Ac 1^{ario}) (IgG de conejo); lavados y adición del Ac 2^{ario} (anti-IgG de conejo-HRP); lavados y adición del sustrato (TMB).

Para ello se procedió como se ha explicado anteriormente, y tras bloquear los sitios inespecíficos de la placa de ELISA, ésta se incubó con diferentes diluciones de los sueros de los conejos durante 1 h a TA. Los Acs IgG de los sueros de los conejos se detectaron incubando la placa durante 1 h a TA con el Ac secundario de cabra anti-IgG-HRP (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) diluido 1/20000.

14.2. ELISA DE INHIBICIÓN

En los ensayos de ELISA de inhibición (**Figura 13**) se empleó como Ac primario un *pool* de sueros de individuos de Madrid (3, 8, 14, 15) diluido 1/3, que había sido previamente incubado con diferentes cantidades (0,1-40 μg) de extracto inhibidor (SMCo o SMCoD₆₀). Este mismo *pool* de sueros sin inhibir se utilizó como control positivo, y la solución de bloqueo como control negativo. Transcurridas 2 h de incubación y realizados los lavados pertinentes, se incubó la placa con el Ac de cabra anti-IgE humana unido a HRP (SIGMA, Saint Louis, Missouri, EUA) y diluido 1/4000 durante 1 h.

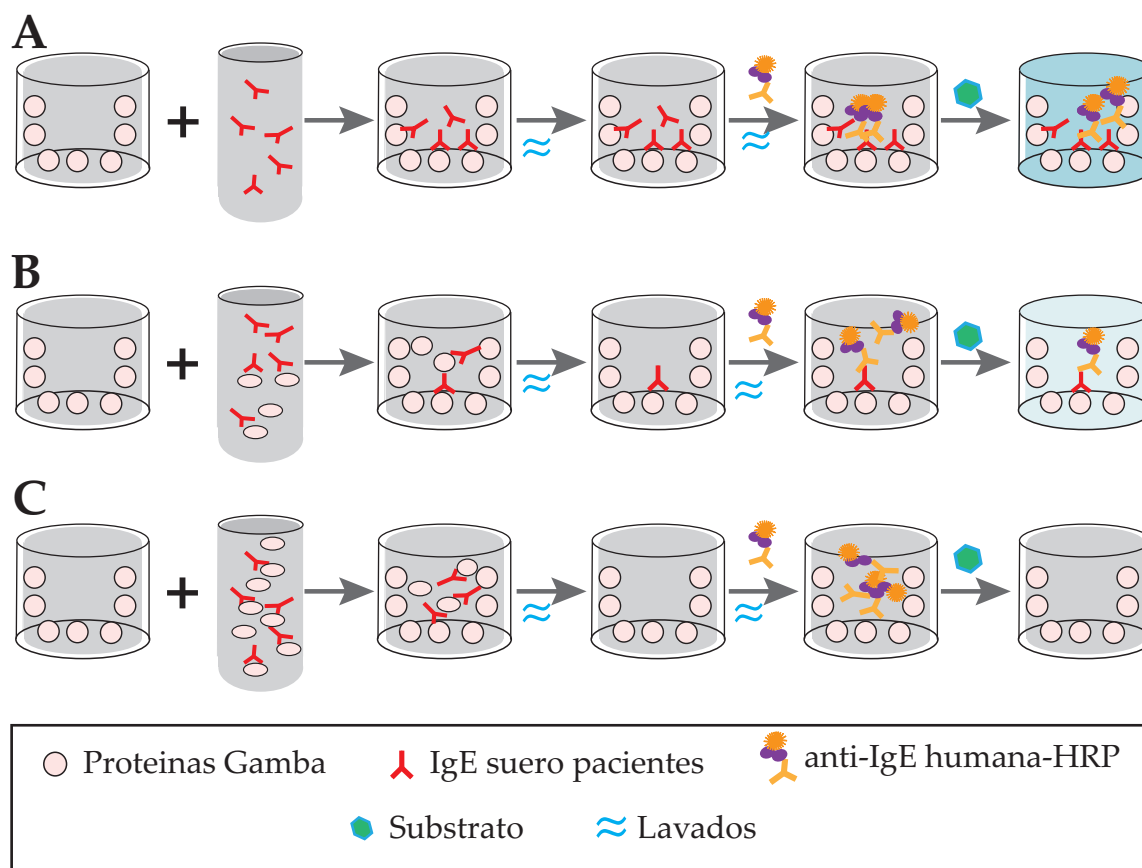


Figura 13. ELISA de Inhibición: Placa de ELISA tapizada con proteínas del extracto de gamba a la cual se le añade el suero de los pacientes (Ac 1^{ario}): (A) suero pacientes (IgE); (B) suero pacientes (IgE) pre-incubado con proteína/extracto inhibidor; (C) suero pacientes pre-incubado con mayor cantidad de proteína o extracto inhibidor. Los pasos sucesivos son los mismos para A, B y C: lavados; adición del Ac 2^{ario} (anti-IgE humana-HRP); lavados y adición del sustrato (TMB).

El porcentaje de inhibición se calculó en función de la DO y según la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 \times (1 - \text{DO}_{\text{In}} / \text{DO}_{\text{NIn}}),$$

dónde DO_{In} y DO_{NIn} son las DO obtenidas con el *pool* de sueros inhibidos y sin inhibir, respectivamente.

Asimismo, mediante este ensayo se puede calcular el valor de Ag_{50} , es decir, la cantidad de extracto inhibidor necesaria para conseguir un 50% de inhibición.

14.3. ELISA DE COMPETICIÓN

En este tipo de ensayo, los sueros de los conejos inmunizados y pre-inms se añadieron a la placa tapizada a una dilución 1/1000 y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, y tras sucesivos lavados, la placa se incubó durante 18 h a 4°C con los sueros de los pacientes individuales diluidos 1/3. Por último, se añadió a la placa el Ac de cabra anti-IgE humana conjugado con HRP (SIGMA, Saint

Louis, Missouri, EUA) diluido 1/1000 y se incubó durante 1 h. En la **Figura 14** se muestra el esquema de este tipo de ensayo.

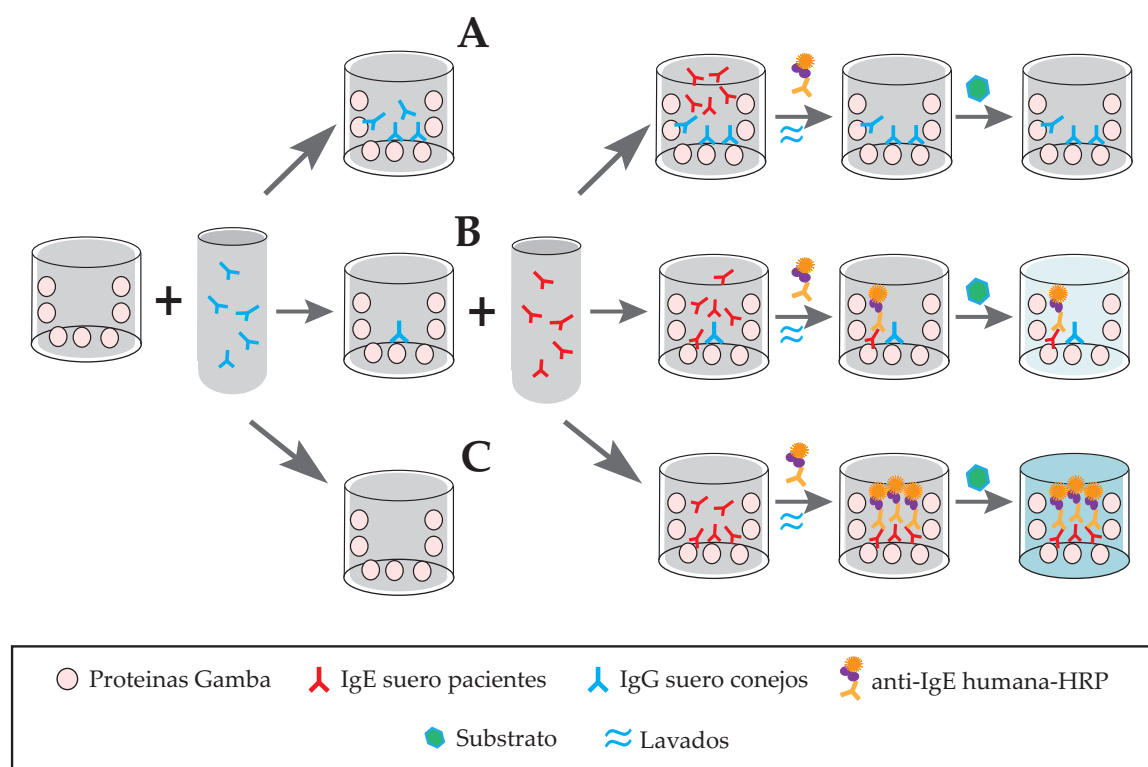


Figura 14. ELISA de Competición: Placa de ELISA tapizada con proteínas del extracto de gamba a la cual se le añade el suero de los conejos: **(A)** suero conejo con elevada cantidad de Acs IgG bloqueantes; **(B)** suero conejo con menos cantidad de Acs IgG bloqueantes; **(C)** suero conejo sin Acs IgG bloqueantes. Los pasos sucesivos son los mismos para A, B y C: lavados; adición del suero de los pacientes (Ac 1^{ario}) (IgE); lavados y adición del Ac 2^{ario} (anti-IgE humana-HRP); lavados y adición del sustrato (TMB).

El índice de competición o inhibición se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Competición (\%)} = 100 \times (1 - \text{DO}_I / \text{DO}_P),$$

dónde DO_I y DO_P son las DO obtenidas con el suero del conejo inmunizado o pre-inmune, respectivamente.

15. TEST DE ACTIVACIÓN DE BASÓFILOS

El TAB se llevó a cabo mediante el kit BasoFlowEx® (EXBIO Diagnostics, Huissen, Holanda), la sangre heparinizada de 5 pacientes sensibilizados a gamba y de un individuo control no atópico y no alérgico. Los estímulos utilizados fueron: los extractos SMC₀ y SMC₆₀, además del FGS+P. Se realizó una curva con diferentes cantidades de estímulo (1, 10, 20 y 40 µg). Como control positivo se usó un Ac anti-IgE

y un péptido quimiotáctico N-Formil-Met-Leu-Phe (fMLP) que produce la activación de los basófilos mediante vía inespecífica.

Conforme a las indicaciones del fabricante del kit BasoFlowEx®, a 100 µL de sangre se le añadieron 10 µL de estímulo y 100 µL de solución de estimulación, agitando los tubos en un *vortex* e incubándolos a 37°C durante 15 min en un baño. A continuación, a cada tubo se le añadieron 20 µL de una mezcla de Acs: un Ac monoclonal anti-CD203c marcado con R-ficoeritrina que marca la población de basófilos, y un Ac monoclonal anti-CD63 marcado con isotiocianato de fluoresceína que sirve para detectar la exposición de CD63 y por tanto la población de basófilos activados.

Los tubos se agitaron en un *vortex* y se incubaron en hielo y en oscuridad durante 20 min. Posteriormente los eritrocitos de las muestras se lisaron añadiendo 300 µL de la solución de lisis del kit, agitando los tubos en el *vortex* y dejando que la solución actúe a TA durante 5 min, antes de parar la reacción añadiendo 4 mL de H₂O_{bd}. A continuación los tubos se centrifugaron a 300 g, durante 5 min a TA. El SBN obtenido se descartó y el precipitado de células se disolvió en 400 µL de Facs Flow (BD Falcon, Bélgica) para posteriormente ser analizado en el citómetro FACS DIVA (BD Falcon, Bélgica).

Los datos obtenidos de la citometría fueron analizados mediante el programa de análisis INFINICYT (Cytognos, Salamanca, España).

16. PURIFICACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

Se purificaron las PBMCs de algunos pacientes sensibilizados a gamba y de un control no atópico mediante la solución Lymphoprep (Comercial Rafer, Zaragoza, España). Todo el proceso de purificación se llevó a cabo en una campana de flujo laminar (Cultek, Madrid, España).

La purificación se realizó a partir de 20 mL de sangre periférica recogida en tubos con EDTA. Conforme a las indicaciones del fabricante, la sangre se mezcló con el mismo volumen de suero salino (SS) al 0,9% en un tubo estéril de 50 mL y la mezcla se homogenizó. A continuación se añadió, lentamente, la sangre diluida con SS a la solución de Lymphoprep según la proporción 3:5 (v/v) y se centrifugó a 1400 rpm durante 30 min sin freno, obteniéndose así las fases propias de la separación en gradiente de densidad: el sedimento, formado por las células de la serie roja (eritrocitos, plaquetas) y los granulocitos; la capa de ficoll menos densa encima de este sedimento; a continuación un aro blanquecino correspondiente a las PBMCs; y por último el plasma en la fase superior.

Se aisló el plasma y se hicieron alícuotas, almacenándolas a -80°C para su posterior uso.

Se recogió la franja de células mononucleares, a la cual se le añadió SS y se centrifugó a 1750 rpm durante 10 min a 7°C para ser lavada. El proceso de lavado se repitió una vez más.

A continuación se realizó el recuento de células viables con el colorante azul tripán en una cámara Neubauer. Las células se suspendieron en medio de cultivo completo (MCC), que contiene medio RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Bélgica), penicilina 50U/mL, estreptomicina 50 µg/mL, piruvato sódico 5 mM, glutamina 2 mM y STFi al 10% (Lonza, Verviers, Bélgica), dejándolas a una concentración de $1-1,5 \times 10^6$ células/mL para su posterior uso. Las células que se congelaron y guardaron en nitrógeno líquido se dejaron a una concentración de 6×10^6 células/mL de MCC al cual se le había añadido 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; SIGMA, Saint Louis, Missouri, EUA).

17. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T

La medida de la proliferación de linfocitos T se realizó mediante el kit *Cell Proliferation Biotrak ELISA System* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) basado en la cuantificación de la 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) incorporada durante la síntesis de ADN de las células que están proliferando.

Las condiciones del ensayo de proliferación fueron 250000 células/200 µL/ pocillo en placas de cultivo estériles Costar de 96 pocillos (Corning Incorporated, NY, EUA) junto con los extractos SMC₀ y SMC₆₀ como estímulos (100 µg). Además de estos estímulos, se utilizaron como control positivo un estímulo inespecífico fitohemaglutinina (PHA), y como controles negativos el FGS+P y el MCC. Todos los puntos del ensayo se realizaron por triplicado.

Las células estimuladas se incubaron a 37°C durante 18 h en una estufa con 5% de CO₂ (modelo 3111, Forma Scientific, Inc, CA, EUA). A continuación se añadieron 10 µL de BrdU 100 µM a las células estimuladas y se volvieron a incubar en la estufa. Transcurridos 5 días del cultivo se midió la incorporación de BrdU en el ADN de las células. Para ello se centrifugó la placa a 300 g, 10 min a TA y se eliminó el SBN con la pipeta. A continuación, las células se secaron a 60°C durante 1 h, para luego añadirles 200 µL de solución de fijación del kit, permitiendo que las células se adhieran a la placa y el ADN se desnaturalice durante 1 h. Después, los sitios inespecíficos de la placa se bloquearon durante 30 min con la solución comercial del kit, y posteriormente la placa se incubó durante 2 h con el Ac anti-BrdU marcado con HRP y diluido 1:50. Tras varios lavados se añadió el sustrato TMB y la reacción se paró añadiendo H₂SO₄ 1 M. Por último se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas TECAN (TECAN, Männedorf, Suiza).

La proliferación se expresa según el índice de estimulación (IE), el cual se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$IE = PE/PC$$

donde PE representa la DO de cada estímulo y PC la DO obtenida de las células con el MCC.

18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las características de los pacientes han sido definidas usando estadísticos descriptivos, como la media geométrica y su desviación estándar (SD).

El carácter de normalidad se analizó con el test de Kolmogorov-Smirnov.

Las comparaciones entre los grupos de estudio en función de la sintomatología o en función de los resultados de la PODCCP se realizaron usando el test de Kruskal-Wallis y U-test de Mann-Whitney para los datos no paramétricos, y ANOVA y test no pareado con la corrección de Welch para los datos paramétricos.

La disminución del área de las pápulas, al igual que la disminución de la activación de basófilos con el extracto de gamba cocido digerido se expresó en relación con el área y la activación obtenidas con el extracto de gamba sin digerir. La significación estadística de estas diferencias se estudió mediante el test de Wilcoxon, dado el bajo número de muestra por grupo y su carácter no paramétrico.

Se considera que existen diferencias estadísticamente significativas a partir de una $P \leq 0,05$, es decir, se acepta como máximo una probabilidad de error no superior al 5%.

El análisis estadístico realizado en este estudio se ha llevado a cabo usando el programa Graphpad Instat3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

1.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y SINTOMATOLOGÍA DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO

1.1.1. POBLACIÓN PROCEDENTE DE ZONA CON CLIMA CONTINENTAL Y SECO (MADRID)

Los sujetos procedentes de los hospitales de Madrid que cumplían el criterio de inclusión y firmaron el consentimiento informado fueron 36 individuos.

De estos 36 sujetos, 18 presentaban síntomas sólo con marisco (50%), mientras que los 18 restantes (50%) presentaban sintomatología tanto con ácaros como con marisco.

En el estudio también se incluyeron 9 sujetos con sintomatología frente a ácaros y tolerancia al marisco.

Así, en función de la sintomatología que presentaban los pacientes, éstos se clasificaron en los siguientes grupos: sintomatología sólo con marisco (M), sintomatología con ácaros y marisco (A+M) y por último, sintomatología sólo con ácaros (A) (**Figura 15**).

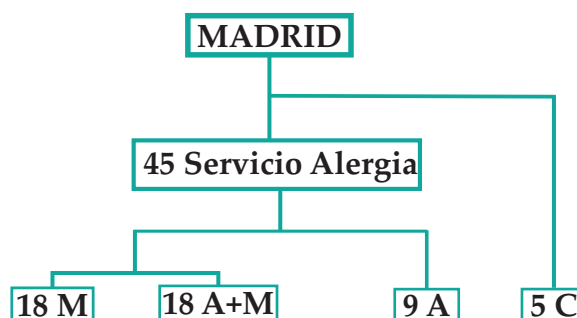


Figura 15. Esquema de la clasificación de los individuos de Madrid según la sintomatología. M: síntomas con marisco; A+M: síntomas con ácaro y marisco; A: síntomas con ácaro; C: controles no atópicos y no alérgicos.

Además, se incluyeron 5 individuos control (C), los cuales no presentaban síntomas alérgicos frente a ningún alérgeno alimentario ni neumalérgeno.

Respecto a los datos demográficos de los 45 individuos reclutados para el estudio, 22 eran hombres (48,9%) y 23 mujeres (51,1%). La media de edad era de $23,9 \pm 13,9$ años, siendo 17 niños ($8,8 \pm 4,5$ años) y 28 adultos ($33,1 \pm 8,4$ años).

En la **Tabla V** se recogen los datos demográficos individuales de los sujetos incluidos en el estudio, además de los síntomas que manifestaba cada individuo.

Tabla V. Características demográficas y presentación clínica de los pacientes de Madrid.

| Nº Pcte. | Sexo | Edad (años) | Presentación Clínica | Sintomatología Gamba | Ácaro |
|----------|------|-------------|----------------------|----------------------|--------|
| 1 | Ms | 33 | Ma, Aca | SAO, GI | Rc |
| 2 | F | 33 | Ma, Aca | AN | Rc, As |
| 3 | F | 28 | Ma, Aca | R, A, U | Rc, As |
| 4 | Ms | 33 | Ma, Aca | AN | Rc, As |
| 5 | F | 16 | Ma, Aca | GI | Rc |
| 6 | Ms | 48 | Ma, Aca | R, GI | R, As |
| 7 | Ms | 8 | Ma, Aca | U | As |
| 8 | F | 43 | Ma, Aca | U | R |
| 9 | Ms | 13 | Ma, Aca | SAO, GI, U | Rc |
| 10 | Ms | 5 | Ma, Aca | U | Rc |
| 11 | Ms | 3 | Ma, Aca | SAO, U | Rc |
| 12 | Ms | 14 | Ma, Aca | As | As |
| 13 | F | 26 | Ma | AN | |
| 14 | F | 7 | Ma | U | |
| 15 | Ms | 9 | Ma | U, AE | |
| 16 | F | 15 | Ma | Rc, U | |
| 17 | Ms | 7 | Ma | Rc | |
| 18 | Ms | 4 | Ma | U | |
| 19 | F | 36 | Ma, Aca | U, R | Rc, As |
| 20 | F | 29 | Ma, Aca | U | Rc |
| 21 | F | 12 | Ma, Aca | SAO, U | Rc |
| 22 | F | 18 | Ma, Aca | SAO | Rc |
| 23 | F | 41 | Ma, Aca | Rc | Rc |
| 24 | Ms | 36 | Ma, Aca | R | Rc, As |
| 25 | Ms | 31 | Ma | U | |
| 26 | F | 32 | Ma | U, GI | |
| 27 | Ms | 47 | Ma | D, AE | |
| 28 | Ms | 26 | Ma | U, D, R | |
| 29 | F | 24 | Ma | U | |
| 30 | F | 40 | Ma | GI | |
| 31 | F | 39 | Ma | U | |
| 32 | Ms | 5 | Ma | Rc | |
| 33 | F | 24 | Ma | U | |
| 34 | Ms | 7 | Ma | GI | |
| 35 | Ms | 7 | Ma | U, AE | |
| 36 | F | 2 | Ma | U | |
| 37 | F | 43 | Aca | | Rc |
| 38 | Ms | 24 | Aca | | Rc, As |
| 39 | Ms | 26 | Aca | | Rc |
| 40 | Ms | 15 | Aca | | Rc |
| 41 | F | 52 | Aca | | Rc |
| 42 | Ms | 26 | Aca | | Rc |
| 43 | F | 27 | Aca | | Rc |
| 44 | F | 34 | Aca | | Rc |
| 45 | F | 29 | Aca | | As |

Nº Pcte.: paciente; Ms: masculino; F: femenino; Ma: marisco; Aca: ácaro; SAO: síndrome alérgico oral; GI: síntomas gastrointestinales; AN: anafilaxia; U: urticaria; Rc: rinoconjuntivitis; As: asma; R: rinitis; AE: angioedema; D: dermatitis.

La sintomatología que presentaban los pacientes con el marisco es muy variada, siendo el síntoma más común el de urticaria en los grupos A+M y M (**Figuras 16A y 16B**).

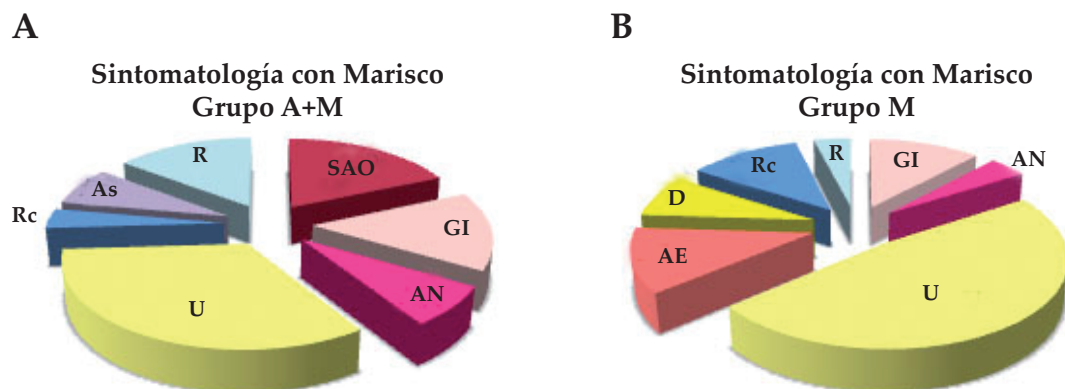


Figura 16. Representación de la frecuencia de los síntomas de los pacientes de Madrid con marisco. A: sintomatología del grupo A+M. B: sintomatología del grupo M.

No obstante, frente a los ácaros, los sujetos presentaban asma, rinitis y rinoconjuntivitis, siendo esta última la sintomatología más frecuente (**Figuras 17A y 17B**).

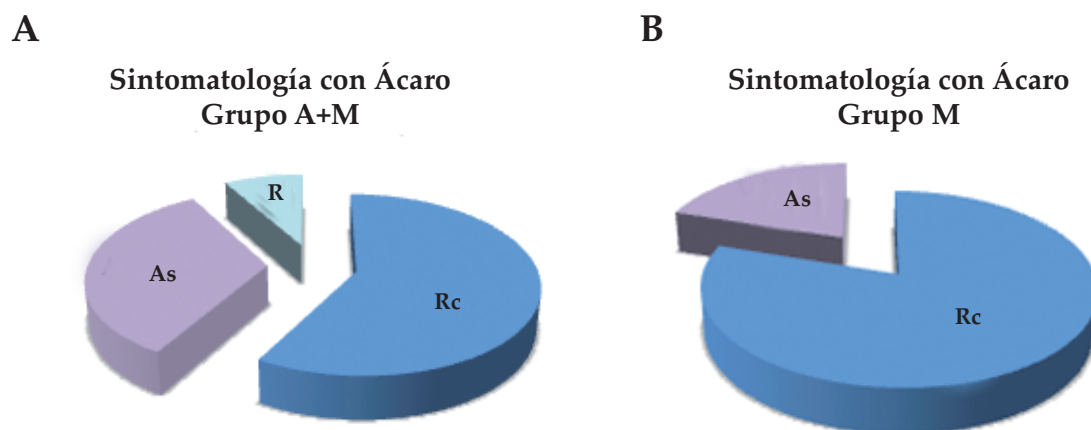


Figura 17. Representación de la frecuencia de los síntomas de los pacientes de Madrid con ácaros. A: sintomatología del grupo A+M. B: sintomatología del grupo M.

Algunos de los síntomas se manifestaron de forma exclusiva en alguno de los grupos de pacientes, siendo estos síntomas, el SAO en el grupo A+M, y angioedema y dermatitis en el grupo M (**Figuras 16A y 16B**, respectivamente). En ambos grupos de pacientes con síntomas frente a marisco, el porcentaje de anafilaxia fue similar (4-7%) (**Figuras 16A y 16B**).

1.1.2. POBLACIÓN PROCEDENTE DE ZONA CON CLIMA COSTERO Y HÚMEDO (LUGO)

Veintinueve individuos de Lugo se incluyeron en el estudio, de los cuales 20 (69%) presentaban sintomatología con ácaros y mariscos, 4 (13,8%) sólo con mariscos y 5 (17,2%) exclusivamente con ácaros (**Tabla VI**).

Tabla VI. Características demográficas, presentación clínica y SPT a gamba de los pacientes de Lugo.

| Nº Pcte. | Edad | Presentación Clínica | Clínica Inicial | Clínica con Mariscos | SPT Gamba | SPT Ácaro |
|----------|------|-------------------------|--------------------|-------------------------|--------------|--------------|
| 1 | 13 | Ma, Aca | As, R | U, AE | P | P |
| 2 | 37 | Ma, Aca | As | SAO | N | P |
| 3 | 24 | Ma, Aca | R | SAO | P | P |
| 4 | 26 | Ma, Aca | As | SAO | P | P |
| 5 | 44 | Ma, Aca | R | U, AE | N | P |
| 6 | 38 | Ma, Aca | As | SAO | P | P |
| 7 | 24 | Ma, Aca | R, D | EP | N | P |
| 8 | 19 | Ma, Aca | R | GI | N | P |
| 9 | 15 | Ma, Aca | R | GI | N | P |
| 10 | 34 | Ma, Aca | U, AE | AN | P | P |
| 11 | 44 | Ma, Aca | R | SAO | N | P |
| 12 | 37 | Ma, Aca | R | U | N | P |
| 13 | 53 | Ma, Aca | U, AE | U, AE | P | P |
| 14 | 17 | Ma, Aca | POF | U, AE | P | P |
| 15 | 33 | Ma, Aca | As, R | U, AE | N | P |
| 16 | 17 | Ma, Aca | R, U, AE | U, AE | P | P |
| 17 | 17 | Ma, Aca | As, R | U, AE | P | P |
| 18 | 27 | Ma, Aca | R | U, AE | P | P |
| 19 | 69 | Ma, Aca | As, R | As, U | P | P |
| 20 | 20 | Ma, Aca | R, U, AE | U, AE | P | P |
| 21 | 53 | Ma | U, AE, DS | AN | P | P |
| 22 | 15 | Ma | R, U | U,AE | P | P |
| 23 | 28 | Ma | POF | NC | P | P |
| 24 | 25 | Ma | U, AE | U,AE | P | P |
| 25 | 7 | Aca | As, R | GI | N | P |
| 26 | 41 | Aca | R | AE | N | P |
| 27 | 39 | Aca | As, R | GI | N | P |
| 28 | 13 | Aca | As, R | U | N | P |
| 29 | 30 | Aca | R | GI | N | P |

Nº Pcte: paciente; Ma: marisco; Aca: ácaro; SAO: síndrome alérgico oral; GI: síntomas gastrointestinales; AN: anafilaxia; U: urticaria; As: asma; R: rinitis; AE: angioedema; D: dermatitis; DS: disnea; POF: prurito oro-faríngeo; EP: edema parpebral; NC: no come marisco. SPT: *skin prick test*. N: negativo; P: positivo.

En relación con las características demográficas (**Tabla VI**), la edad media de los sujetos de estudio de esta población es de $29,6 \pm 14,3$ años, siendo la mayoría adultos (82,7%). En éstos la media de edad es de $33,2 \pm 13,1$ años y de $12,6 \pm 3,3$ años en los niños.

La clínica inicial de esta población es de rinitis y asma, siendo estos dos síntomas los más frecuentes entre los individuos del grupo A+M, y los únicos síntomas que se manifiestan en los pacientes del grupo A. No obstante, la urticaria y el angioedema son las manifestaciones clínicas iniciales dominantes entre los individuos del grupo M (**Figura 18**).

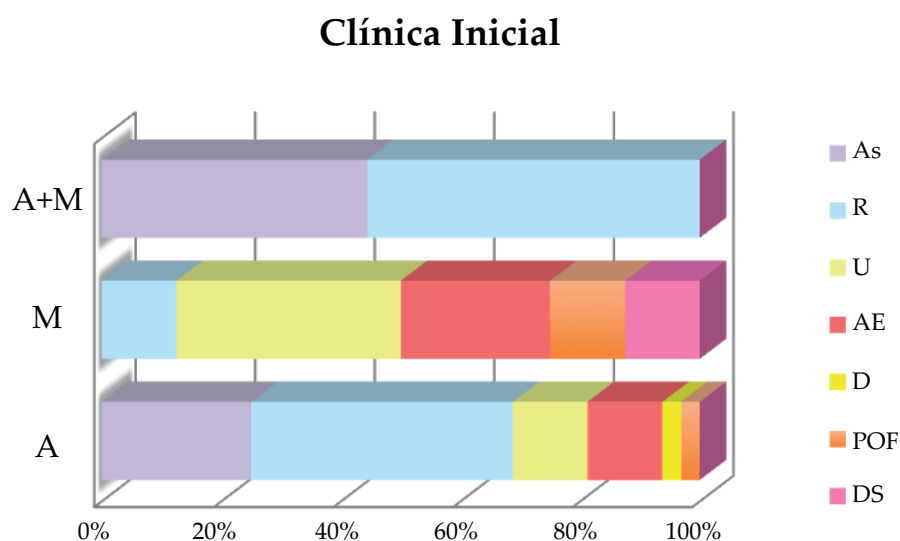


Figura 18. Representación de la frecuencia de la clínica inicial de los pacientes de Lugo. Grupo A+M: síntomas con ácaro y marisco; Grupo M: síntomas con marisco; Grupo A: síntomas con ácaro. Síntomas: As: asma; R: rinitis; U: urticaria; AE: angioedema; D: dermatitis; POF: prurito orofaríngeo.

La clínica frente al marisco de esta población se caracteriza por urticaria y angioedema, siendo estos los principales síntomas en los grupos A+M y M. El SAO es el tercer síntoma más abundante en el grupo A+M, al igual que lo es la anafilaxia en el grupo M (**Figuras 19A, 19B**, respectivamente). Los síntomas gastrointestinales son las principales manifestaciones clínicas en el grupo A de esta población (**Figura 19C**).

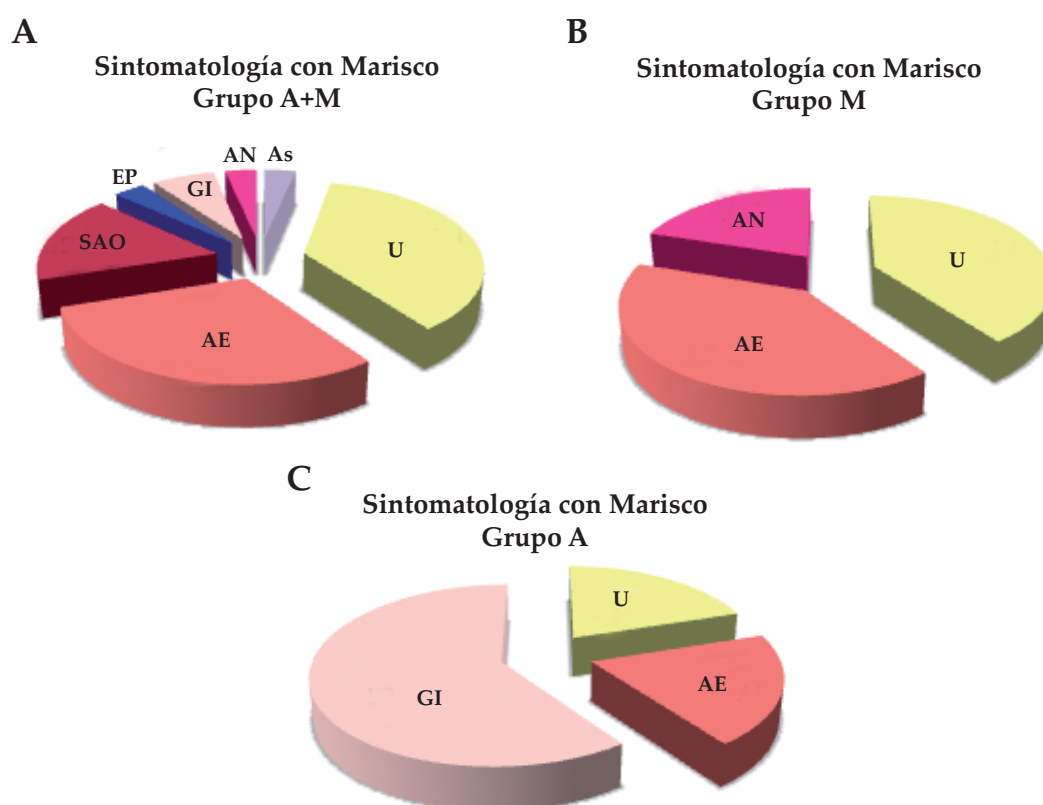


Figura 19. Representación de la frecuencia de síntomas de los pacientes de Lugo con el marisco. A) Grupo A+M: síntomas con ácaros y marisco. B) Grupo M: síntomas con marisco. C) Grupo A: síntomas con ácaros. Síntomas: As: asma; U: urticaria; AE: angioedema; EP: edema parpebral; AN: anafilaxia; SAO: síndrome alérgico oral; GI: síntomas gastrointestinales.

1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO

1.2.1. PROVOCAIONES ORALES DOBLE CIEGO CONTROLADAS CON PLACEBO

Para valorar si los individuos presentaban o no alergia a la gamba, se realizaron pruebas de PODCCP con la especie *S. melanthero*.

La PODCCP se llevó a cabo en los pacientes de Madrid, a excepción de 14 individuos, de los cuales 7, debido a su historia clínica con reacciones sistémicas severas tras la ingesta de gambas, no se sometieron a dicha prueba por no estar indicado. Los otros 7 sujetos excluidos de la realización de la PODCCP se negaron a realizar la prueba dado que afirmaban tolerar la gamba tras haberla ingerido recientemente de forma accidental; así estos sujetos se consideraron negativos a la hora de clasificarlos según la PODCCP. Los resultados individuales de la PODCCP se muestran en la tabla de las características clínicas de los pacientes (Tabla VII).

Tabla VII. Características clínicas de los pacientes de Madrid.

| Nº Pcte. | PODCCP | Diagnóstico Definitivo | SPT Gamba | IgE específica a gamba kUA/L | IgE específica a Pen a 1 kUA/L | IgE específica a <i>D. pteronyssinus</i> kUA/L |
|----------|--------|------------------------|-----------|------------------------------|--------------------------------|--|
| 1 | P | P | P | 2,72 | 0,46 | 13,90 |
| 2 | NI | P | P | 100,0 | >100 | 46,0 |
| 3 | NI | P | P | 7,03 | 2,03 | NR |
| 4 | NI | P | P | 6,15 | 2,83 | 2,27 |
| 5 | P | P | P | 5,24 | 4,34 | 26,70 |
| 6 | P | P | P | 2,47 | <0,35 | 0,82 |
| 7 | NI | P | P | >100 | >100 | 14,1 |
| 8 | NI | P | P | 0,84 | <0,35 | 0,79 |
| 9 | P | P | P | 5,5 | 0,79 | 2,15 |
| 10 | P | P | P | 50,4 | 40,3 | 10,3 |
| 11 | P | P | P | 13,7 | 7,85 | 0,86 |
| 12 | P | P | P | 24,2 | 16,6 | 10,5 |
| 13 | NI | P | P | 5,60 | 2,60 | <0,35 |
| 14 | NI | P | P | >100 | 61,8 | 11,1 |
| 15 | P | P | P | 11,7 | 9,48 | 5,75 |
| 16 | P | P | P | 96,7 | 95,5 | 18,7 |
| 17 | P | P | P | 0,6 | 0,41 | <0,35 |
| 18 | NR | P | P | 39,8 | 25,8 | 4,57 |
| 19 | N | N | N | <0,35 | <0,35 | 1,19 |
| 20 | N | N | P | 0,44 | <0,35 | 0,75 |
| 21 | NR | N | P | 5,98 | <0,35 | 1,56 |
| 22 | N | N | P | 0,55 | 0,38 | 1,26 |
| 23 | N | N | P | 0,48 | <0,35 | 9,75 |
| 24 | N | N | P | <0,35 | <0,35 | 2,03 |
| 25 | N | N | P | 0,62 | <0,35 | 0,46 |
| 26 | N | N | N | <0,35 | <0,35 | <0,35 |
| 27 | N | N | N | <0,35 | <0,35 | <0,35 |
| 28 | N | N | N | <0,35 | <0,35 | <0,35 |
| 29 | N | N | N | <0,35 | <0,35 | <0,35 |
| 30 | N | N | P | <0,35 | <0,35 | 0,52 |
| 31 | N | N | N | <0,35 | <0,35 | 0,66 |
| 32 | NR | N | N | 0,81 | 0,48 | 0,68 |
| 33 | N | N | P | 2,15 | 0,71 | <0,35 |
| 34 | NR | N | P | 15,4 | 8,62 | 1,94 |
| 35 | N | N | P | 16,5 | 10,1 | 2 |
| 36 | NR | N | P | 0,41 | 0,38 | <0,35 |
| 37 | N | N | N | <0,35 | <0,35 | <0,35 |
| 38 | N | N | N | <0,35 | <0,35 | 3,75 |
| 39 | N | N | N | 5,77 | <0,35 | NR |
| 40 | N | N | N | 2,76 | <0,35 | 8,56 |
| 41 | N | N | N | <0,35 | <0,35 | 0,41 |
| 42 | N | N | N | <0,35 | <0,35 | 5,68 |
| 43 | N | N | N | <0,35 | <0,35 | 2,36 |
| 44 | NR | N | N | 5,92 | <0,35 | 8,16 |
| 45 | NR | N | P | 1,45 | <0,35 | 60,2 |

Nº Pcte.: paciente; PODCCP: provocación oral doble ciego controlada con placebo; SPT: *skin prick test*; P: positivo; N: negativo; NI: no indicado; NR: no realizado.

De acuerdo con los síntomas y los resultados de la prueba de PODCCP, los pacientes se clasificaron en 3 grupos: pacientes con provocación oral positiva (POP), (N=18); pacientes con provocación oral negativa (PON), (N=18) y pacientes con provocación oral negativa y sintomatología en relación con sensibilización a ácaros que toleran el marisco (A), (N=9). En la **Figura 20** se muestran de forma esquematizada estos resultados.

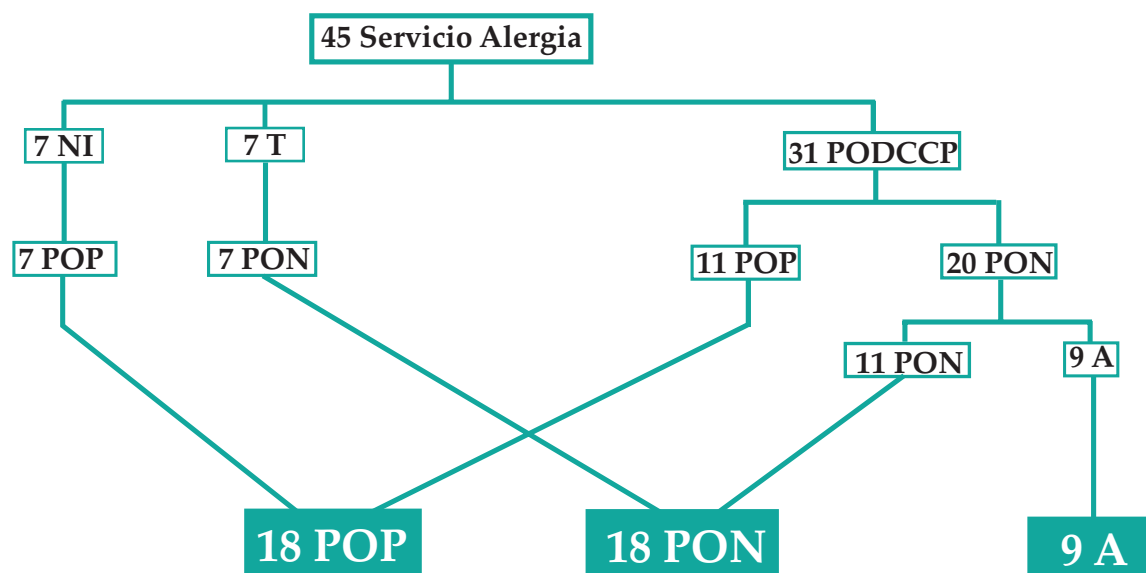


Figura 20. Esquema de la clasificación de los individuos de Madrid incluidos en el estudio conforme a los resultados de la PODCCP. NI: no indicado; T: toleran la ingesta de gamba; POP: provocación oral positiva; PON: provocación oral negativa; A: PON y síntomas exclusivos con ácaros.

Dentro del grupo POP, 12 de los 18 pacientes también presentaban síntomas respiratorios frente a los ácaros, y en el grupo PON, lo hacían 6 de los 18 pacientes.

1.2.2. PRUEBAS CUTÁNEAS

Las pruebas cutáneas frente al extracto de gamba se consideraron positivas cuando la media del diámetro mayor y el diámetro ortogonal de la pápula resultante era ≥ 3 mm.

La positividad de esta prueba fue de un 67% (30/45) en los pacientes de Madrid, y de un 83% en los de Lugo.

Cuando se estudió la positividad del SPT en función de la sintomatología, como cabría esperar, el porcentaje de positividad de esta prueba era significativamente mayor en el grupo A+M y M que en el grupo A de la población de Madrid (A+M *vs* A, $P<0,0001$; y M *vs* A, $P<0,05$) (**Figura 21A**).

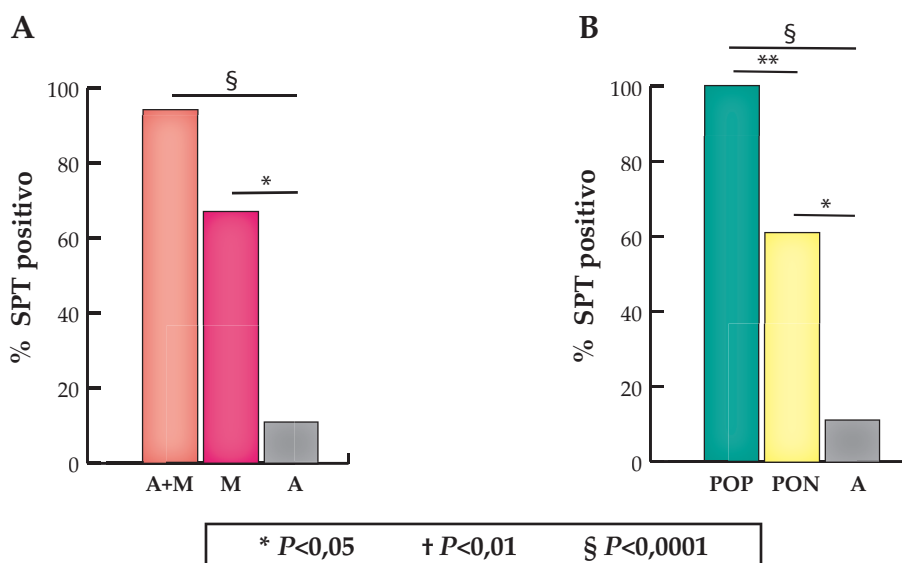


Figura 21. Porcentajes de individuos con SPT positivo con gamba según sintomatología (A) y resultado de la PODCCP (B).

Cuando la población de estudio de Madrid se separa en función del resultado de la PODCCP, todos los individuos (100%) POP resultaron tener la prueba cutánea positiva. Sin embargo, este porcentaje descendía al 61% en el grupo PON, y tan sólo el 11% de los pacientes del grupo A presentaban SPT positivo, siendo estas diferencias significativas con respecto al grupo POP ($P < 0,01$ y $P < 0,0001$, respectivamente). Entre los grupos PON y A también se alcanzan diferencias estadísticamente significativas respecto a este porcentaje (PON *vs* A, $P < 0,05$) (Figura 21B).

Por otro lado, la mayoría de individuos A+M de Lugo tenían SPT positivo a la gamba (60%) y, como cabía esperar, esta prueba resultó negativa en todos los del grupo A, mientras que para la totalidad de los individuos del grupo M fue positiva.

La totalidad de los individuos de Lugo tuvieron resultados positivos cuando el SPT se realizó con el extracto de ácaro.

1.2.3. IgE ESPECÍFICA FRENTE A GAMBA, ÁCARO Y rPen a 1

Los valores individuales de IgE específica frente a los extractos de gamba (*P. monodon*) y ácaro (*D. pteronyssinus*) como al alérgeno mayoritario recombinante de gamba rPen a 1 obtenidos mediante el sistema Streptavidin-InmunoCAP®, se muestran en la Tabla VII.

Considerando valorables los niveles de IgE específica mayor o igual a 0,35 kU/L, el 71% de los pacientes de Madrid (32/45) tenían niveles positivos de IgE específica a gamba, el 79% (34/43) a *D. pteronyssinus* y el 49% (22/45) al alérgeno rPen a 1.

En función de la sintomatología de los pacientes, los porcentajes de positividad de la IgE específica a gamba eran del 89% (16/18), 67% (12/18) y 44% (4/9) para los grupos A+M, M y A, respectivamente, siendo significativas las diferencias encontradas entre los grupos A+M *vs* A ($P < 0,05$) (Figura 22A).

El 100% del grupo A+M poseía IgE específica a *D. pteronyssinus*, mientras que este porcentaje disminuía al 87,5% (7/8) en el grupo A y hasta un 55,5% (10/18) en el grupo M. Esta disminución sólo alcanzó la significación estadística entre los grupos A+M vs M ($P<0,05$) (**Figura 22A**).

Al analizar los valores de IgE frente a rPen a 1, el 61,1% (11/18) de los individuos de los grupos A+M y M tenían valores positivos de IgE específica frente a este alérgeno, mientras que ninguno del grupo A los tenía. Estas diferencias respecto al grupo A son altamente significativas ($P<0,005$) (**Figura 22A**).

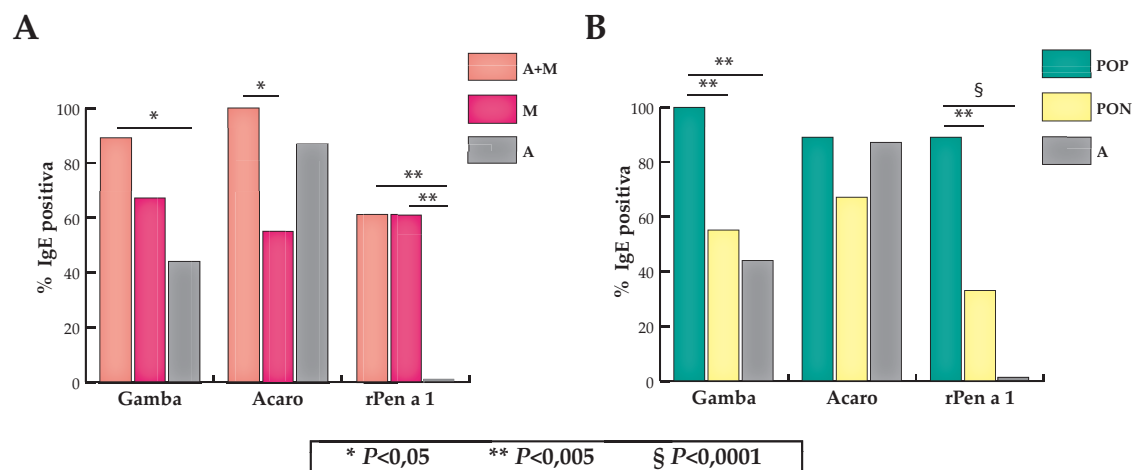


Figura 22. Porcentajes de individuos de Madrid que poseen IgE específica frente a gamba, nPen a 1 y *D. pteronyssinus* detectada mediante InmunoCAP®. (A) Según sintomatología: Grupo A+M: síntomas con ácaro y marisco, Grupo M: síntomas con marisco, Grupo A: síntomas con ácaro. (B) Conforme resultado PODCCP: POP: provocación oral positiva, PON: provocación oral negativa; A: provocación oral negativa y síntomas sólo a ácaro.

Al separar los pacientes según la PODCCP, los porcentajes de IgE específica frente a gamba fueron positivos para la totalidad de los pacientes POP, comparado con el 55% de los PON y el 44% de los pacientes del grupo A, alcanzándose diferencias estadísticamente significativas ($P<0,005$) (**Figura 22B**).

No existen diferencias significativas respecto al porcentaje de individuos que presentaron IgE específica frente a *D. pteronyssinus*.

Conforme al alérgeno rPen a 1, la IgE específica es positiva en los grupos POP y PON, siendo estadísticamente mayor en el grupo POP que en el PON ($P<0,005$). En el grupo A, el porcentaje de la positividad de IgE específica frente a Pen a 1 es prácticamente nula, alcanzando diferencias significativas al compararlo con el porcentaje del grupo POP ($P<0,0001$) (**Figura 22B**).

Cuando se comparan los valores medios de IgE específica frente a los extractos de ácaro y gamba, y teniendo en cuenta la sintomatología de los individuos (**Figura 23A**), no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes. Sin embargo, los valores medios de IgE específica frente a rPen a 1 son significativamente mayores en los grupos A+M y M que en el grupo A, dado que los individuos de este grupo poseen valores negativos o no valorables de IgE específica frente a este alérgeno ($25\pm33,8$ y $19,6\pm31$; A+M y M, respectivamente; $P<0,0001$).

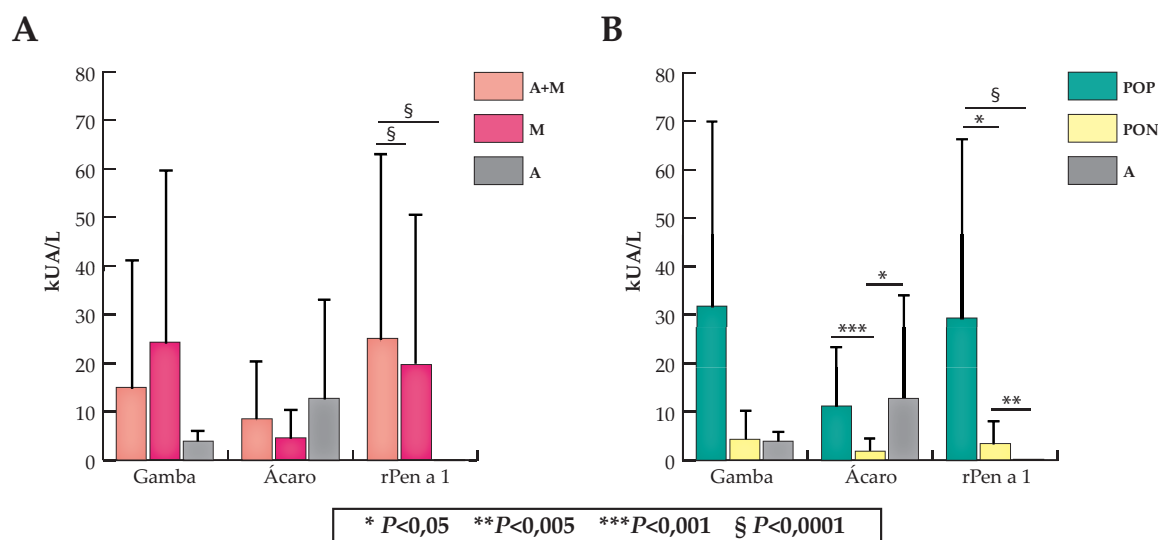


Figura 23. Valores medios de IgE específica frente a gamba, ácaro y rPen a 1. A: según sintomatología, Grupo A+M: síntomas con ácaro y marisco; Grupo M: síntomas con marisco; Grupo A: síntomas con ácaros. B: según PODCCP, POP: provocación oral positiva; PON: provocación oral negativa.

El valor medio de IgE específica frente a gamba es mayor en el grupo POP que en los grupos PON y A, aunque las diferencias no alcanzan la significación estadística (POP vs PON $27,8 \pm 36,6$ vs $4,3 \pm 6,3$ kUA/L; POP vs A $27,8 \pm 36,6$ vs $4 \pm 2,2$ kUA/L) (**Figura 23B**).

Los valores medios de IgE específica frente al ácaro, son significativamente superiores en el grupo POP respecto al grupo PON ($11,2 \pm 12,2$ vs $1,9 \pm 2,5$ kUA/L, $P < 0,001$); y en el grupo A respecto al grupo PON ($12,7 \pm 21,1$ vs $1,9 \pm 2,5$ kUA/L, $P < 0,05$), siendo el valor medio prácticamente idéntico entre los grupos POP y A (**Figura 23B**).

Los valores medios de IgE específica frente a rPen a 1 del grupo PON son muy inferiores a los del grupo POP, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). También se obtienen diferencias significativas respecto al grupo A, en el cual el valor medio de IgE frente a rPen a 1 no alcanza valores positivos (POP vs A, $P < 0,0001$, PON vs A, $P < 0,005$) (**Figura 23B**).

2. CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA FUENTE ALERGÉNICA

2.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO DE LA GAMBA *Solenocera melanthero*

Mediante la técnica explicada en materiales y métodos se obtuvo el extracto proteico de gamba cruda. Se valoró el rendimiento del proceso de extracción y se comprobó que a partir de 1 g de gamba (peso seco), se obtenían entre 3,5 y 5 mg/mL de proteína.

2.2. ESTUDIO DEL PERFIL PROTEICO DEL EXTRACTO DE LA GAMBA *Solenocera melantho*

El perfil electroforético del extracto de gamba se obtuvo mediante la separación de las proteínas de dicho extracto en geles SDS-PAGE. En este perfil se observan bandas proteicas comprendidas en el rango de PM entre 2 y > 210 kDa (**Figura 24**).

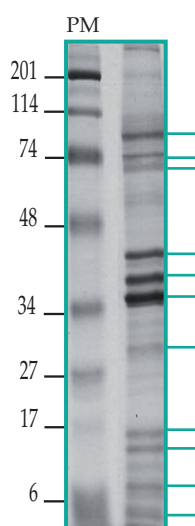


Figura 24. SDS-PAGE de las proteínas (20 µg) de la gamba *S. melantho*. Los PMs de los marcadores se indican a la izquierda del gel, expresados en kDa. Las líneas verdes de la figura señalan las bandas más predominantes del perfil proteico de la gamba *S. melantho*.

Las bandas proteicas más predominantes, según su intensidad, se encuentran alrededor de 14, 17, 37-39, 40-42, 74 y 84-94 kDa, seguidas de otras proteínas menos intensas con PMs equivalentes a 2-7, 10-13, 30, 45-60 y mayores de 120 kDa (**Figura 24**).

2.3. ESTUDIO DEL PERFIL ALERGÉNICO DE LAS PROTEÍNAS DEL EXTRACTO DE LA GAMBA *Solenocera melantho*

Con el objetivo de estudiar el perfil alergénico de las proteínas del extracto de *S. melantho*, se realizaron inmunodetecciones con los sueros de los 45 pacientes del estudio procedentes de Madrid (**Figura 25**).

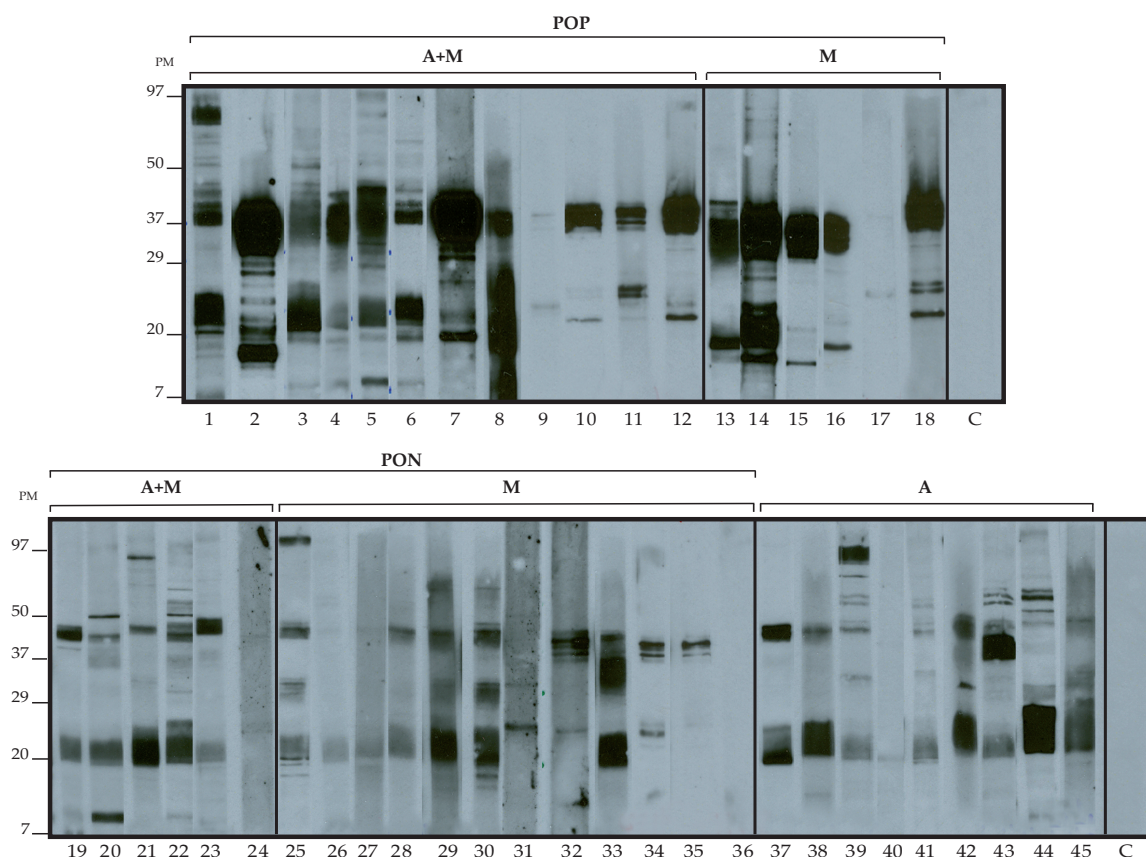


Figura 25. Inmunodetección con los sueros individuales de pacientes de Madrid. Según PODCCP: POP (1-18), PON (19-36) y PON que toleran la gamba (A) (37-45); o según sintomatología: A+M (1-12 y 19-24), M (13-18 y 25-36) y A (37-45). C: inmunodetección con suero de individuo no atópico como control negativo. PMs (en kDa).

Como puede observarse en la **Figura 25**, el extracto de la gamba *S. melantho* presentó numerosas bandas proteicas capaces de unir IgE específica del suero de los pacientes. Cuarenta y tres sueros (95%) presentaban anticuerpos IgE específicos frente al menos una banda proteica del extracto de la gamba *S. melantho*, de los cuales el 14% (6/43) tenían IgE específica frente a 1 ó 2 bandas proteicas.

En el alergograma (**Figura 26**) se representan, de forma individualizada y esquematizada, las bandas proteicas que son capaces de unir IgE de los sueros de cada uno de los pacientes. Además, en este esquema se detallan las frecuencias de reconocimiento de cada banda proteica en función de los grupos de individuos según la sintomatología y según los resultados de la provocación oral.

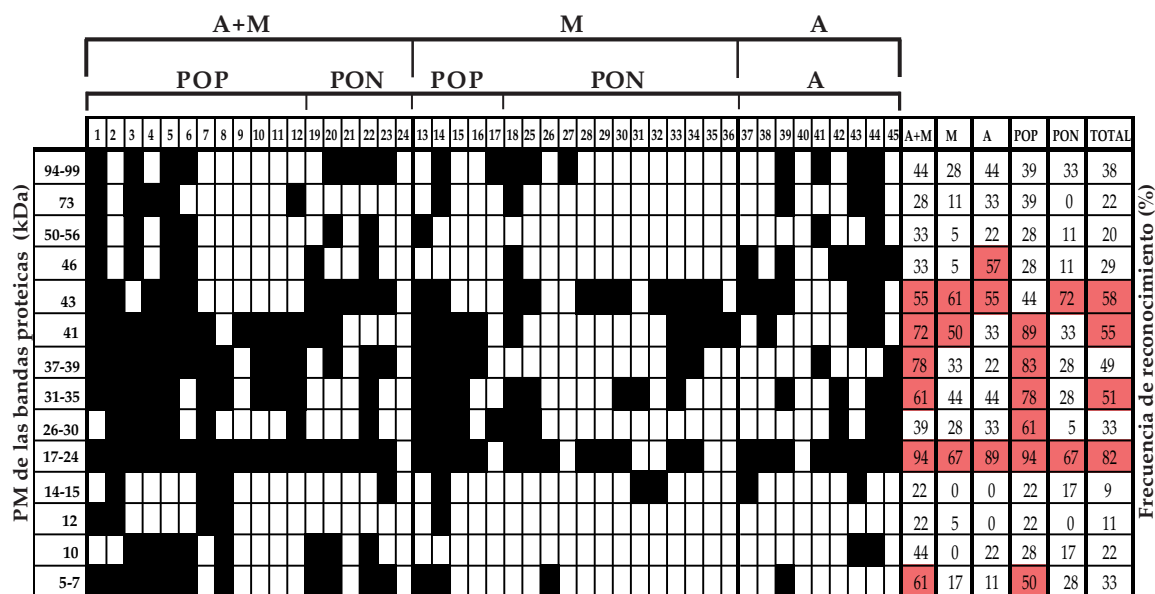


Figura 26. Alergograma de la población de Madrid frente al extracto de gamba. A la izquierda se encuentran los PMs (kDa) de las bandas proteicas detectadas. A la derecha se muestran las frecuencias de reconocimiento de cada banda proteica según los distintos grupos: A+M, M, A, POP, PON y TOTAL. Las casillas coloreadas en rojo señalan las proteínas con una frecuencia de reconocimiento $\geq 50\%$.

En el alergograma se observa que más del 50% de los sueros de la población estudiada tienen IgE frente a las bandas de 17-24, 31-35, 41 y 43 kDa, considerándose pues, como alérgenos mayoritarios en esta población.

La banda proteica de 37-39 kDa, correspondiente con la TM, no llegó al 50% de reconocimiento (49%) de la población total estudiada, pero este porcentaje alcanza el 55% si de la población total se excluyen los individuos con sintomatología sólo con ácaros. Sin embargo, el 78% de los pacientes del grupo A+M reconocen la TM de la gamba *S. melantho*, al igual que lo hacen el 80% de los individuos POP.

Según la sintomatología de los pacientes, las bandas proteicas que presentan mayor frecuencia de reconocimiento ($\geq 50\%$) (en rojo **Figura 26**), son más numerosas en el grupo A+M, siendo éstas las de PM equivalentes a 5-7, 17-24, 31-35, 37-39, 41, y 43 kDa. En tanto que entre los individuos A, son las bandas de 17-24, 43 y 46 kDa las que superan el 50% de reconocimiento, y tan sólo las bandas 17-24 y 43 kDa alcanzan esta frecuencia en los individuos M (**Figura 26**).

El porcentaje de reconocimiento de la proteína de PM equivalente al de la TM es del 78%, 33% y 22% para los grupos A+M, M y A, respectivamente.

De igual modo, los individuos POP reconocen un mayor número de bandas que los PON. Las bandas detectadas por más del 50% de los individuos POP son las de PM alrededor de 5-7, 17-24, 26-30, 31-35, 37-39, 41, 43, 46 kDa, manteniéndose este porcentaje en el grupo PON sólo para las bandas proteicas de 17-24 y 43 kDa.

Al comparar los porcentajes de reconocimiento de las bandas proteicas, observamos que existen diferentes perfiles alergénicos de la gamba en función del grupo de pacientes. Estas diferencias son significativas, por ejemplo, cuando se compara el porcentaje de reconocimiento de la TM del extracto de *S. melanthro* (37-39 kDa) entre los

grupos POP, PON y A (83%, 28% y 22%, respectivamente) (POP vs PON; $P < 0,005$ y POP vs A; $P < 0,005$).

2.4. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DEL EXTRACTO DE GAMBA *Solenocera melantho* MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Una vez estudiado el perfil alergénico del extracto de la gamba *S. melantho*, y determinados los alérgenos mayoritarios en la población de estudio, se identificaron dichas proteínas mediante MS.

Además de los alérgenos mayoritarios, también se identificó la banda proteica de alto peso molecular (94-99 kDa) dado que, aun no siendo un alérgeno mayoritario, un alto porcentaje (44%) de los sueros de los grupos A+M y A poseían IgE específica capaz de reconocer dicha banda, con lo cual podría estar implicada en la RC entre ácaros y marisco.

Igualmente se identificó por MS la proteína de alrededor de 5 kDa del extracto de *D. pteronyssinus*.

Los resultados obtenidos de la identificación de las proteínas mediante MALDI-TOF y su análisis posterior en el programa MASCOT, se muestran de forma resumida en la **Tabla VIII**.

Tabla VIII. Resumen del análisis MASCOT de las proteínas identificadas mediante MS o MS/MS

| Proteína | Organismo | GI | Masa Teórica | pI | Mowse Score (P<0,05) | Max Mowse Score | Péptidos Coincidentes | % Secuencia Cubierta |
|--------------------|--------------------------------|-----------|--------------|------|----------------------|-----------------|-----------------------|----------------------|
| α -Actinina | <i>Drosophila ananassae</i> | 194768725 | 107325 | 5,45 | Score >76 | 95 | 22 | 25% |
| β -Actina | <i>Cherax quadricarinatus</i> | 40887063 | 42298 | 5,11 | Score >84 | 93 | 13 | 35% |
| FBPA | <i>Loa loa</i> | 312071888 | 39725 | 8,1 | Score >77 | 104 | 4 | 14% |
| AK | <i>Litopenaeus vannamei</i> | 307334072 | 36765 | 6,84 | Score >84 | 139 | 19 | 46% |
| TM (1) | <i>Lethocerus indicus</i> | 220980842 | 32867 | 4,7 | Score >77 | 118 | 6 | 29% |
| TM (2) | <i>Metapenaeus ensis</i> | 6094504 | 31686 | 4,66 | Score >84 | 99 | 15 | 45% |
| TM (3) | <i>Metapenaeus ensis</i> | 6094504 | 31686 | 4,67 | Score >84 | 99 | 15 | 45% |
| SCP (1) | <i>Penaeus sp.</i> | 134315 | 22239 | 4,52 | Score >77 | 114 | 5 | 27% |
| SCP (2) | <i>Penaeus sp.</i> | 134315 | 22239 | 4,53 | Score >77 | 112 | 1 | de novo |
| SCP (3) | <i>Penaeus sp.</i> | 134315 | 22239 | 4,54 | Score >77 | 112 | 1 | de novo |
| UB | <i>Drosophila melanogaster</i> | 158759 | 8548 | 6,56 | Score >27 | 31 | 1 | 17% |
| UB (Ácaro) | <i>Bos taurus</i> | 290560476 | 8289 | 5,73 | Score >85 | 115 | 9 | 84% |

Fructosa bifosfato aldolasa (FBPA), arginin kinasa (AK), tropomiosina (TM), proteína sarcoplásmica de unión de calcio (SCBP), ubiquitina (UB). Punto isoeléctrico (pI). Máximo (Max).

La secuencia proteica de las proteínas identificadas, así como el porcentaje de dicha secuencia que cubren los péptidos obtenidos del análisis por MS, se recogen en el Anexo I.

Del análisis de las bandas proteicas de alrededor de 20 kDa y de 17-19 kDa, se obtuvieron secuencias peptídicas que no mostraron una probabilidad significativa de correspondencia con proteínas conocidas. En este caso se realizó un análisis por MS/MS

de ambas proteínas de PM aparente de 22-24, 20 y 17-19 kDa, obteniendo una secuencia *de novo* del péptido interno de 1754,8 daltons, cuya secuencia es **TIDVDGDGMVGLDEYR**, y que presentó homología significativa con la SCBP de *Penaeus sp.* (GI: 134315).

Dado que se cumplían los criterios establecidos previamente de probabilidad asociada a la búsqueda estadísticamente significativa, es decir, correspondencia de más de 5 péptidos y una cobertura de secuencia superior al 20%, para cada proteína analizada, la identificación de estas proteínas se consideró inequívoca.

Por lo tanto, se identificaron las proteínas: α -actinina, β -actina, fructosa bifosfato aldolasa (FBPA), AK, TM, SCBP y ubiquitina (UB), como alérgenos de la gamba *S. melanthero* (Figura 27).

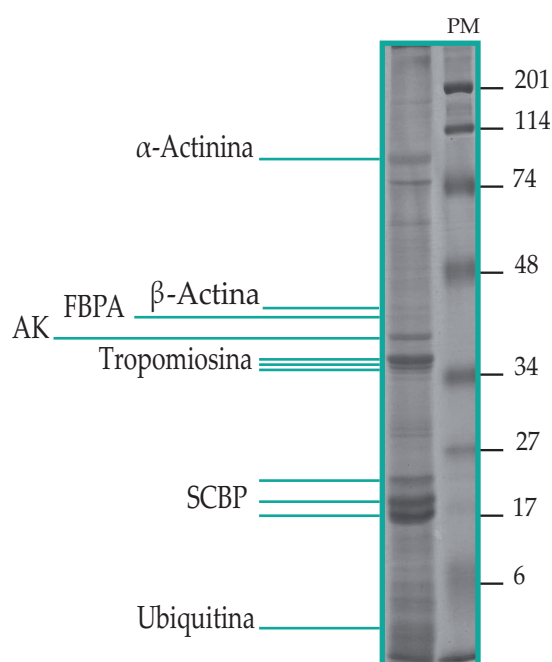


Figura 27. SDS-PAGE de las proteínas (50 μ g) del extracto de la gamba *S. melanthero*. A la izquierda del gel se señalan las proteínas identificadas mediante MS o MS/MS, y a la derecha se muestran los PMs (en kDa). FBFA: fructosa bifosfato aldolasa; AK: arginin kinase; SCBP: proteína sarcoplásmica de unión de calcio.

Además, en el extracto del ácaro *D. pteronyssinus* se identificó la proteína de bajo PM (5-7 kDa) como homóloga a la ubiquitina de *Bos taurus*.

2.4.1. COMPROBACIÓN DE QUE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS ESTÁN PRESENTES EN LA GAMBA *Solenocera melanthero*

Con el objetivo de corroborar que las proteínas identificadas se encuentran presentes en la gamba *S. melanthero*, se inmunizaron conejos con el extracto de gamba *S. melanthero*, obteniendo así el suero anti-SM, el cual se utilizó para realizar inmunodetecciones del extracto completo de gamba junto con las proteínas identificadas de diferente origen animal. Esto se realizó mediante 2 técnicas:

a. Inmunodetección de las proteínas separadas en un gel SDS-PAGE: el perfil electroforético de las proteínas comerciales empleadas (α -actinina de molleja de pollo, β -actina de músculo bovino, FBPA de músculo de conejo y UB de eritrocitos de origen bovino) se muestra en la **Figura 28A**. Tal y como se observa en la inmunodetección de estas proteínas (**Figura 28B**), el suero de conejo utilizado detecta la mayoría de las proteínas del extracto de la gamba *S. melanthero* (línea 1, **Figura 28B**). Además, este suero es capaz de reconocer las proteínas comerciales empleadas como la α -actinina, β -actina y FBPA.

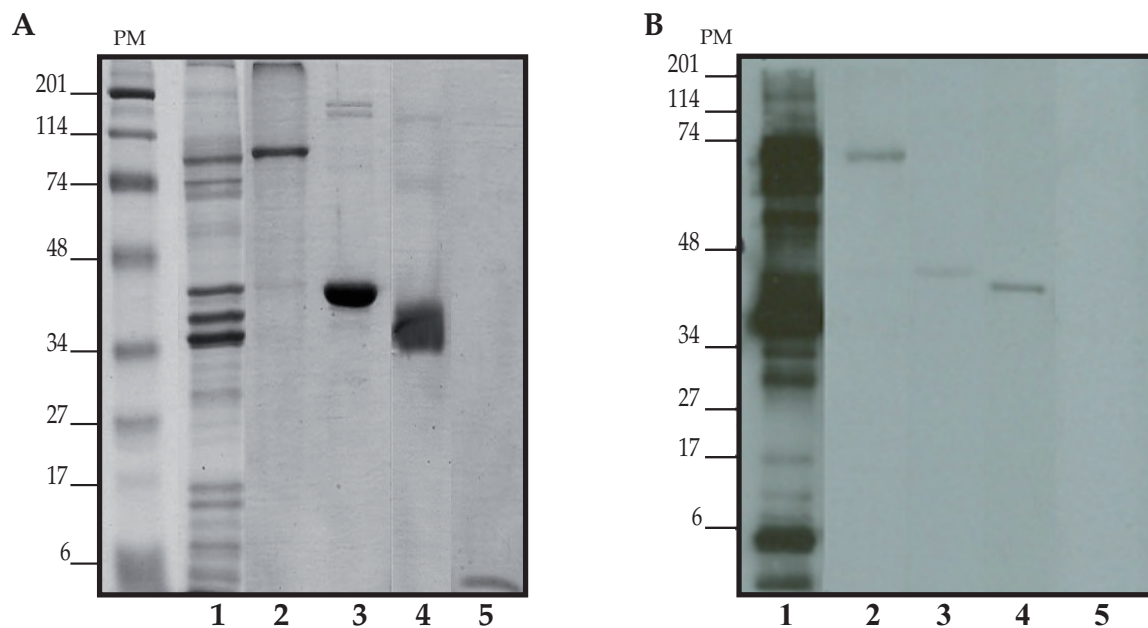


Figura 28. SDS-PAGE e inmunodetección de las proteínas identificadas en la gamba *S. melanthero*. A: SDS-PAGE de *S. melanthero* (20 μ g/carril 1), α -actinina de molleja de pollo (2,5 μ g/carril 2), β -actina de músculo bovino (2,5 μ g/carril 3), FBPA de músculo de conejo (2,5 μ g/carril 4) y UB de eritrocitos de origen bovino (40 μ g/carril 5). B: inmunodetección del extracto de *S. melanthero* y de las proteínas identificadas usando el suero de conejo anti-SM. Para la inmunodetección se utilizaron las mismas muestras y cantidades que para el SDS-PAGE de la figura 28A, a excepción del carril 1 en el que se cargaron 10 μ g. PMs (en kDa).

b. Inmunodetección mediante *dot-blot*: En la **Figura 29** se muestra como el suero anti-SM de conejo detecta casi todas las proteínas o extractos empleados; a excepción de la UB, y la proteína BSA, utilizada esta última como control negativo. Aunque la FBPA fue detectada tanto por el suero de conejo anti-SM como el pre-inm, la intensidad de reconocimiento fue mayor con el suero anti-SM (100% *vs* 20%).

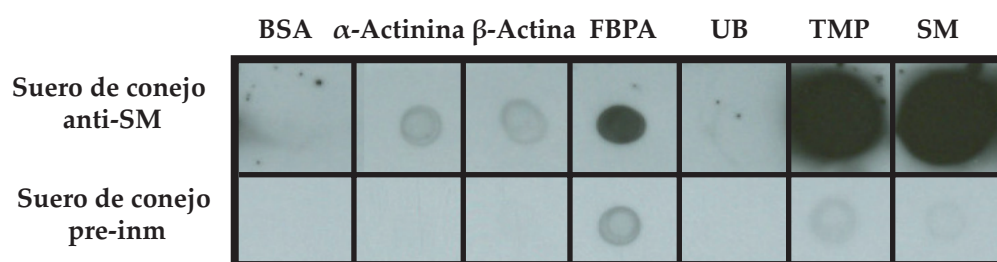


Figura 29. Dot-blot de las proteínas identificadas en la gamba *S. melanthero* utilizando los sueros de los conejos anti-SM y pre-inm. Para esta inmunodetección se utilizaron las mismas proteínas que las empleadas en la figura 14, además de la tropomiosina purificada de *S. melanthero* (TMP) como control positivo y BSA, como control negativo. En cada punto se puso la misma cantidad de cada proteína o del extracto completo de gamba (2,5 μ g), a excepción de la UB y BSA (100 μ g).

2.4.2. CONFIRMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS COMO NUEVOS ALÉRGENOS DE LA GAMBA *Solenocera melanthero*

Para demostrar que las proteínas identificadas mediante MS son, en efecto, alérgenos de la gamba *S. melanthero*, se realizaron inmunodetecciones mediante dot-blot con un pool de sueros de pacientes de Madrid (2, 14, 15 y 23) que tenían IgE específica frente a las proteínas identificadas de la gamba.

Tal como se observa en la Figura 30, el pool de sueros de pacientes tenía IgE específica frente a α -actinina, β -actina, FBPA, TM y al extracto completo de gamba, pero no frente a la UB empleada.

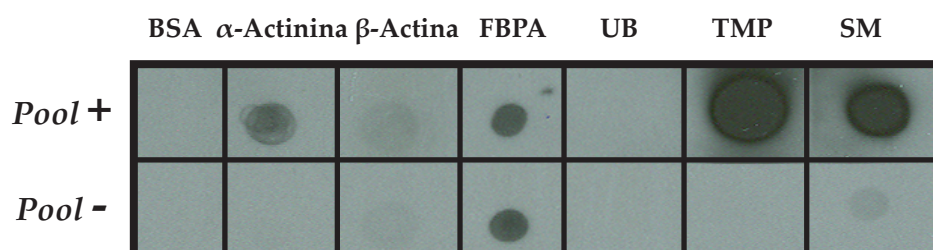


Figura 30. Dot-blot de las proteínas identificadas en la gamba *S. melanthero* utilizando un pool de sueros de pacientes sensibilizados a la gamba (Pool +) y de individuos atópicos no alérgicos (Pool -). Para esta inmunodetección se utilizaron las mismas proteínas que las empleadas en la figura 14, además de la tropomiosina purificada de *S. melanthero* (TMP) como control positivo y BSA, como control negativo. Las cantidades de proteína empleada fueron: FBPA (1 μ g); β -actina (2,5 μ g); α -actinina, TMP y SM (5 μ g); UB y BSA (100 μ g).

Tanto el pool de sueros de sujetos sensibilizados a gamba como el pool de sueros de controles negativos eran capaces de detectar la FBPA, aunque la intensidad de reconocimiento era superior con el pool de sueros de sujetos sensibilizados a gamba (100% vs 79%). Esto se corroboró mediante inmunodetección de la FBPA separada en un gel SDS-PAGE (Figura 31) (100% pool pacientes vs 69%, pool controles).

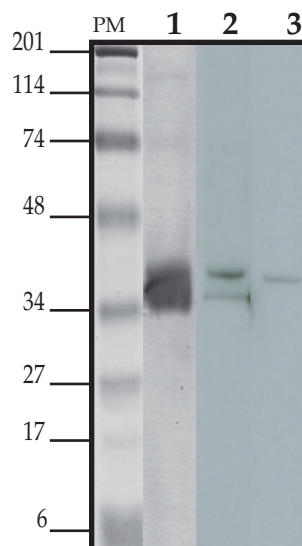


Figura 31. SDS-PAGE (1) e inmunodetección de la proteína FBPA purificada comercial (1 µg/carril). Pool de sueros de pacientes sensibilizados a gamba (2) y de individuos no atópicos (3). PMs (en kDa).

2.5. PURIFICACIÓN DE LA TROPOMIOSINA DE LA GAMBA *Solenocera melantho*

Con el fin de conseguir la TM purificada de la gamba *S. melantho* (TMP) se obtuvo un extracto proteico, del cual se eliminaron primero las proteínas sarcoplasmáticas, y a continuación se llevaron a cabo dos precipitaciones, una isoelectrica y otra con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

En la **Figura 32** se observan los diferentes SBNs y precipitados de los distintos pasos del proceso de purificación de la TM

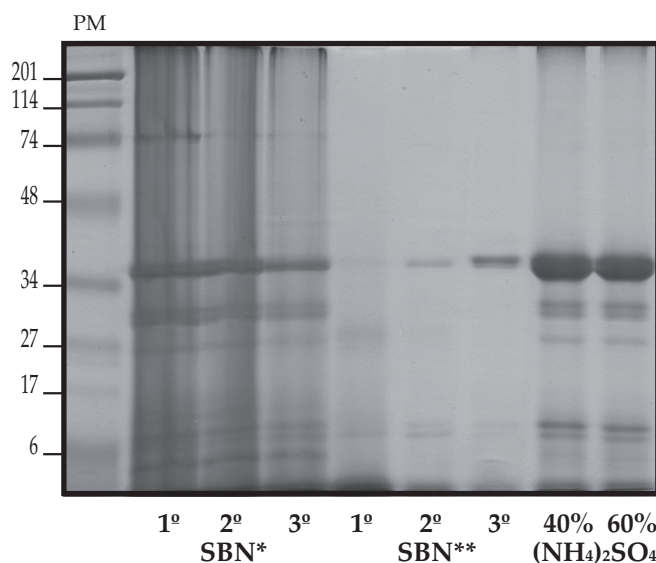


Figura 32. Estudio mediante SDS-PAGE de los diferentes pasos de la purificación de la tropomiosina de la gamba *S. melantho*. En el primer carril se muestran los marcadores de PM (en kDa). En los carriles 2-4 se observa el patrón de los SBNs de los 3 pasos para obtener el extracto de gamba sin proteínas sarcoplasmáticas (SBN*, 1º, 2º y 3º paso). En los carriles 5-7 se muestra el perfil de los SBNs de los 3 pasos de la precipitación isoelectrica (SBN** 1º, 2º y 3º paso). El perfil proteico de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40% y 60% se observa en los carriles 8 y 9, respectivamente.

Tras la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40-60% se consiguió una TM parcialmente purificada de la gamba *S. melanthero* (TMP) (Figura 32).

3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA REACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS DE GAMBA Y ÁCARO EN DOS POBLACIONES DIFERENTES: CLIMA CONTINENTAL SECO (MADRID) Y CLIMA COSTERO HÚMEDO (LUGO)

3.1. PERFIL ALERGÉNICO DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO FRENTE AL EXTRACTO DE LA GAMBA *Solenocera melanthero*

Con el objetivo de comparar el perfil alergénico de dos poblaciones con diferentes climas frente a las proteínas de la gamba *S. melanthero*, además de la población de Madrid con clima continental seco, se incorporó al estudio otra población con clima costero húmedo, procedente de Lugo.

Para ello se realizaron inmunodetecciones con los sueros individuales de los pacientes de ambas poblaciones.

El perfil alergénico de la población de clima continental seco frente a las proteínas del extracto de *S. melanthero* se ha detallado previamente en el apartado 2.3. de este mismo capítulo.

Respecto al patrón alergénico de la población de clima costero húmedo frente a las proteínas del extracto de la gamba *S. melanthero*, entre los individuos A+M se observa un grupo que presenta un perfil alergénico muy similar a los individuos M, y otro grupo con el perfil más parecido al de los individuos A (Figura 33).

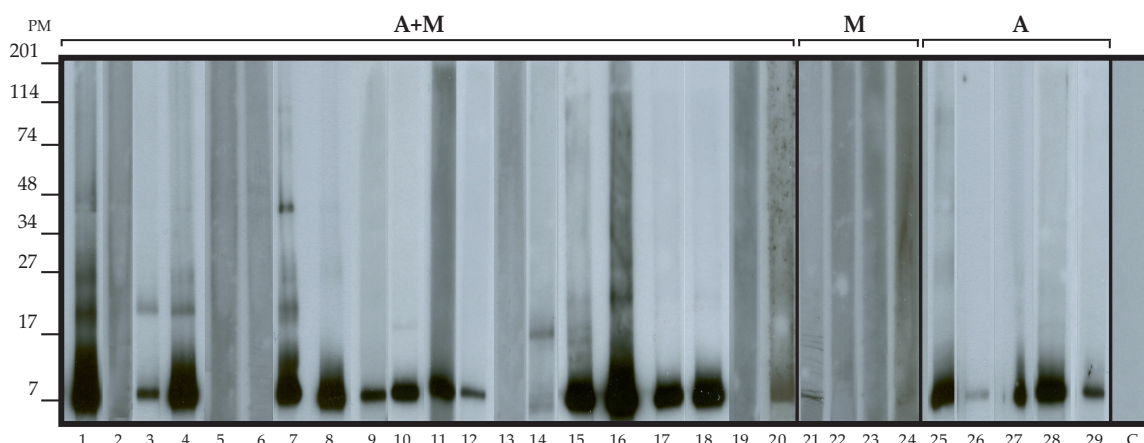


Figura 33. Inmunodetección del extracto de la gamba *S. melanthero* (10 µg/carril) con los sueros individuales de pacientes de Lugo: A+M (1-20), M (21-24) y A (25-29). C: inmunodetección con suero de individuo no atópico como control negativo. PMs (en kDa).

En el alergograma de la población total de Lugo (**Figura 34**) frente al extracto de gamba *S. melanthero* se observa que ninguna proteína de la gamba era detectada por más del 50% del total de esta población, al igual que ocurría en el grupo A. La proteína de 41 kDa, correspondiente con la AK, es la única que alcanzó el 50% de reconocimiento entre los individuos del grupo A+M. Sin embargo, en el grupo M, numerosas bandas eran detectadas por más del 50% de los sueros de estos pacientes, siendo estas proteínas las bandas de PM alrededor de 5-7, 14, 17-24, 27, 30, 37-39, 41, 74 y 84 kDa.

| | A+M | | | | | | | | | | M | | | | | | | | | | A | | | | | | | | | | TOTAL | Frecuencia de reconocimiento (%) |
|-------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-------|----------------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | A+M | M | A |
| 200 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 5 | 0 | 20 | 7 |
| 114 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 5 | 25 | 0 | 7 |
| 94-99 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 15 | 0 | 0 | 10 |
| 84 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 30 | 50 | 0 | 27 |
| 74 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 40 | 50 | 0 | 34 |
| 61 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 5 | 25 | 0 | 7 |
| 54 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 15 | 25 | 0 | 14 |
| 51 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 15 | 0 | 0 | 10 |
| 46 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 5 | 25 | 0 | 7 |
| 44 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 15 | 0 | 0 | 10 |
| 43 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 10 | 0 | 0 | 7 |
| 41 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 50 | 75 | 0 | 45 |
| 37-39 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 35 | 50 | 0 | 31 |
| 31 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 25 | 25 | 0 | 21 |
| 30 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 35 | 50 | 0 | 31 |
| 27-29 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 35 | 50 | 0 | 31 |
| 17-24 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 35 | 100 | 20 | 41 |
| 14 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 35 | 75 | 20 | 38 |
| 5-7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 50 | 50 | 0 | 41 |

Figura 34. Alergograma de la población de Lugo frente a la gamba *S. melanthero*. A la derecha se muestran las frecuencias de reconocimiento de cada banda proteica según los distintos grupos: A+M, M, A; y TOTAL. A la izquierda se indican los PMs (en kDa) de las proteínas detectadas en el extracto de *S. melanthero* por los sueros de estos individuos. Las casillas en rojo señalan las proteínas que fueron detectadas por $\geq 50\%$ de los sueros de esta población.

Si se comparan ambas poblaciones en función del número de bandas que son capaces de detectar, sólo 8 individuos de Lugo, el 27%, frente al 55 % de Madrid, poseían IgE específica frente a 5 ó más bandas proteicas de la gamba *S. melanthero*.

Al observar las inmunodetecciones y alergogramas de ambas poblaciones frente al extracto de la gamba *S. melanthero* (**Figuras 25, 33 y 26, 34**, respectivamente), y comparando el grupo A+M de Madrid y Lugo, observamos que en este grupo el 72% de la población de Madrid reconoce numerosas bandas (≥ 5 bandas), mientras que sólo el 30% de individuos del grupo A+M de Lugo lo hacen. Las bandas que son reconocidas por más del 50% de la población A+M de Madrid son las de 5-7, 17-24, 31-35, 37-39, 41 y 43 kDa, sin embargo en este grupo de Lugo solamente las proteínas de 5-7 y 41 kDa, UB y AK, respectivamente, alcanzan dicho porcentaje de reconocimiento.

Respecto a la población M de Madrid, las bandas de 17-24, 41 y 43 kDa, SCBP, AK y FBPA, respectivamente, alcanzan más del 50% de reconocimiento entre los individuos de esta población; al igual que entre la población M de Lugo lo hacen las proteínas de 5-7, 14, 17-24, 27-28, 30, 37-39, 41, 74 y 84 kDa.

3.2. PERFIL ALERGÉNICO DE LAS POBLACIONES DE ESTUDIO FRENTE AL EXTRACTO DEL ÁCARO *Dermatophagoides pteronyssinus*

Entre la gamba y el ácaro existe una elevada RC, y es por ello que un elevado porcentaje de individuos presentan sintomatología alérgica frente a estas dos fuentes alergénicas.

El porcentaje de individuos incluidos en el estudio que presentan síntomas con ambos alérgenos es del 40% (18/45) y del 69% (20/29) en la población de Madrid y Lugo, respectivamente.

Es por ello que en este trabajo se estudia el perfil alergénico de ambas poblaciones frente al extracto del ácaro *D. pteronyssinus*

El reconocimiento de las proteínas del extracto del ácaro por parte de la población de Madrid fue muy similar respecto a los 3 grupos de pacientes, como se observa en la **Figura 35**.

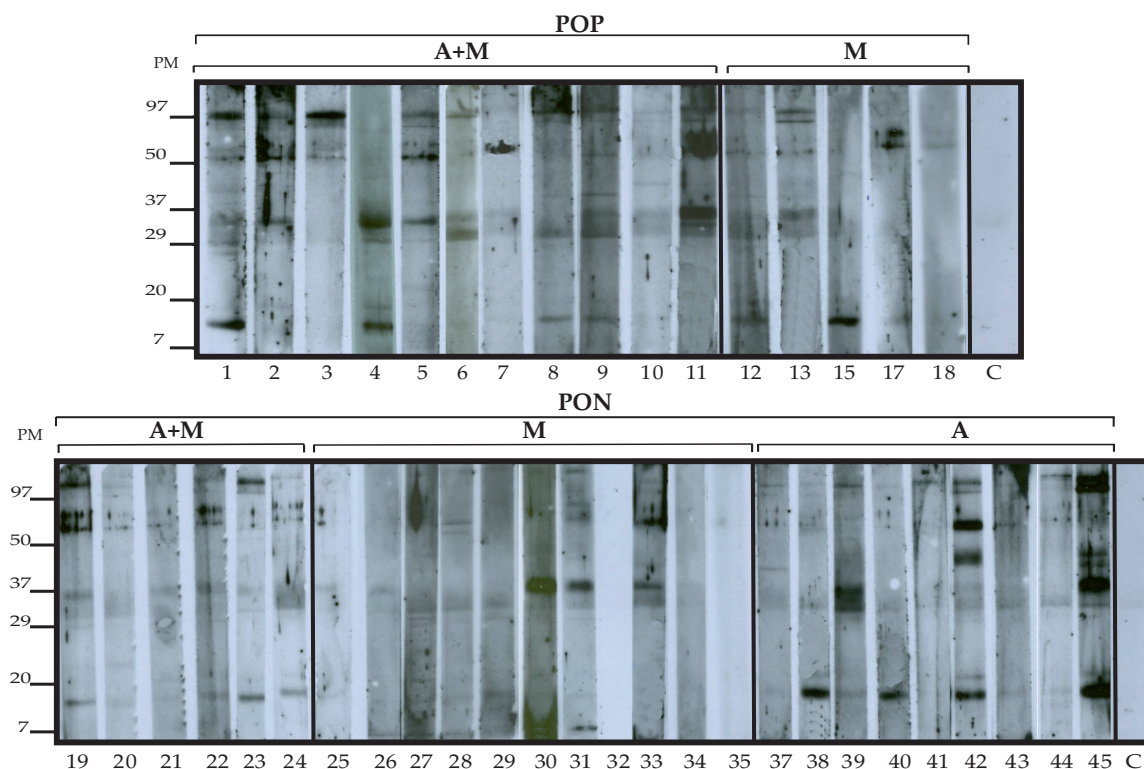


Figura 35. Inmunodetección frente al extracto del ácaro *D. pteronyssinus* (10 µg/carril) utilizando los sueros individuales de pacientes de Madrid: según sintomatología: A+M (1-12 y 19-24), M (13-18 y 25-36) y A (37-45); y según PODCCP: POP (1-13, 15, 17-18), PON (19-35) y A (37-45). C: inmunodetección con suero de individuo no atópico como control negativo. PMs (en kDa).

En Lugo, al igual que ocurre en Madrid, todos los grupos, A+M, M y A, presentaron un perfil de reconocimiento de las proteínas del ácaro muy similar (**Figura 36**), aunque diferentes a los perfiles de la población de Madrid (**Figura 35**).

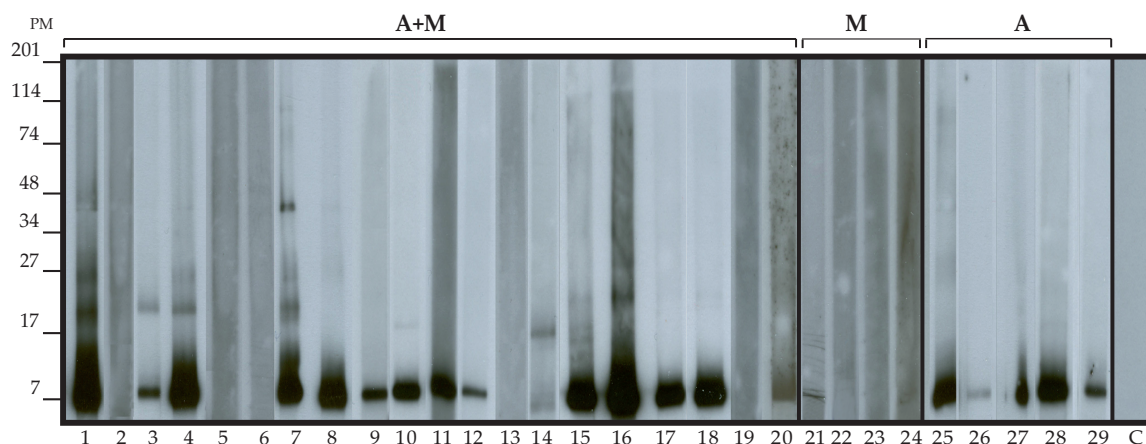


Figura 36. Inmunodetección del extracto del ácaro *D. pteronyssinus* (10 µg/carril) con sueros individuales de pacientes de Lugo: A+M (1-20), M (21-24) y A (25-29). C-: inmunodetección con suero de individuo no atópico como control negativo. PMs (en kDa).

Esto mismo se puede observar en los alergogramas de ambas poblaciones frente a las proteínas del extracto del ácaro *D. pteronyssinus* (**Figura 37**).

En el alergograma de Madrid frente al ácaro (**Figura 37A**) se observa como en el extracto del ácaro no había ninguna banda proteica que fuese reconocida por más del 50% de la población.

Cuando se analizan los perfiles de reconocimiento de la población de Madrid en función de la sintomatología, en el grupo A+M, las bandas de 26-30, 73 y 94-99 kDa eran reconocidas por más del 50% de los individuos de este grupo; y las bandas proteicas de PM de 17-24, 35 y 94-99 kDa lo eran en el grupo A, mientras que en el grupo M ninguna proteína alcanzó el 50% de reconocimiento.

La TM, de 37-39 kDa, aún siendo la proteína descrita como responsable de la RC entre gamba y ácaro, en la población de Madrid no resultó ser un alérgeno mayoritario en el extracto de ácaro dado que en ninguno de los grupos se llegó al 50% de reconocimiento (39%, 40% y 44%, en los grupos A+M, M y A, respectivamente).

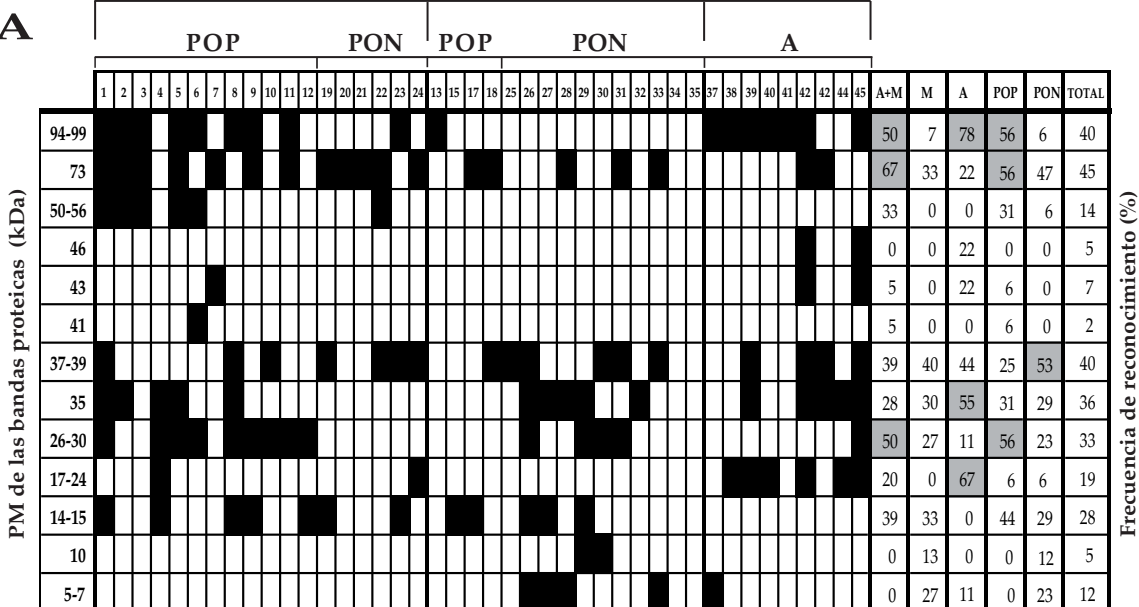


Figura 37. Alergogramas de ambas poblaciones, Madrid (A) y Lugo (B), frente al ácaro *D. pteronyssinus*. A la derecha se muestran las frecuencias de reconocimiento de cada banda proteica según los distintos grupos: A+M, M, A y TOTAL; y a la izquierda los PMs de las bandas proteicas detectadas. Las casillas en gris indican las proteínas detectadas por $\geq 50\%$ de los sueros.

En el alergograma de la población de Lugo frente al ácaro (**Figura 37B**), se observa que la proteína de 5-7 kDa es detectada por la mayoría de los individuos del total de esta población, al igual que lo hacen un elevado porcentaje de los individuos del grupo A+M y la totalidad del grupo A de esta población.

La proteína de 37-39 kDa, equivalente a la TM del extracto de ácaro, sólo es reconocida por un 20% de los sueros de los grupo A+M y A, pero ninguno de los individuos M posee IgE capaz de detectarla.

En consecuencia, en la población de Madrid, y en el extracto del ácaro *D. pteronyssinus*, la proteína de alto PM alrededor de 94-99 kDa, identificada en la gamba *S. melanthero* como homóloga a una α -actinina, es la que tenía una mayor importancia; mientras que en Lugo, la proteína más relevante era la de bajo PM, identificada, tanto en la gamba *S. melanthero* como en el ácaro *D. pteronyssinus*, como UB.

3.3. RELEVANCIA DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN LA GAMBA *Solenocera melanthero* EN LA ALERGIA A MARISCO Y ÁCARO EN AMBAS POBLACIONES

Al analizar los alérgenos identificados en la gamba y el porcentaje de reconocimiento de estas proteínas, se observa un patrón diferente entre los individuos de las dos poblaciones (Figura 38).

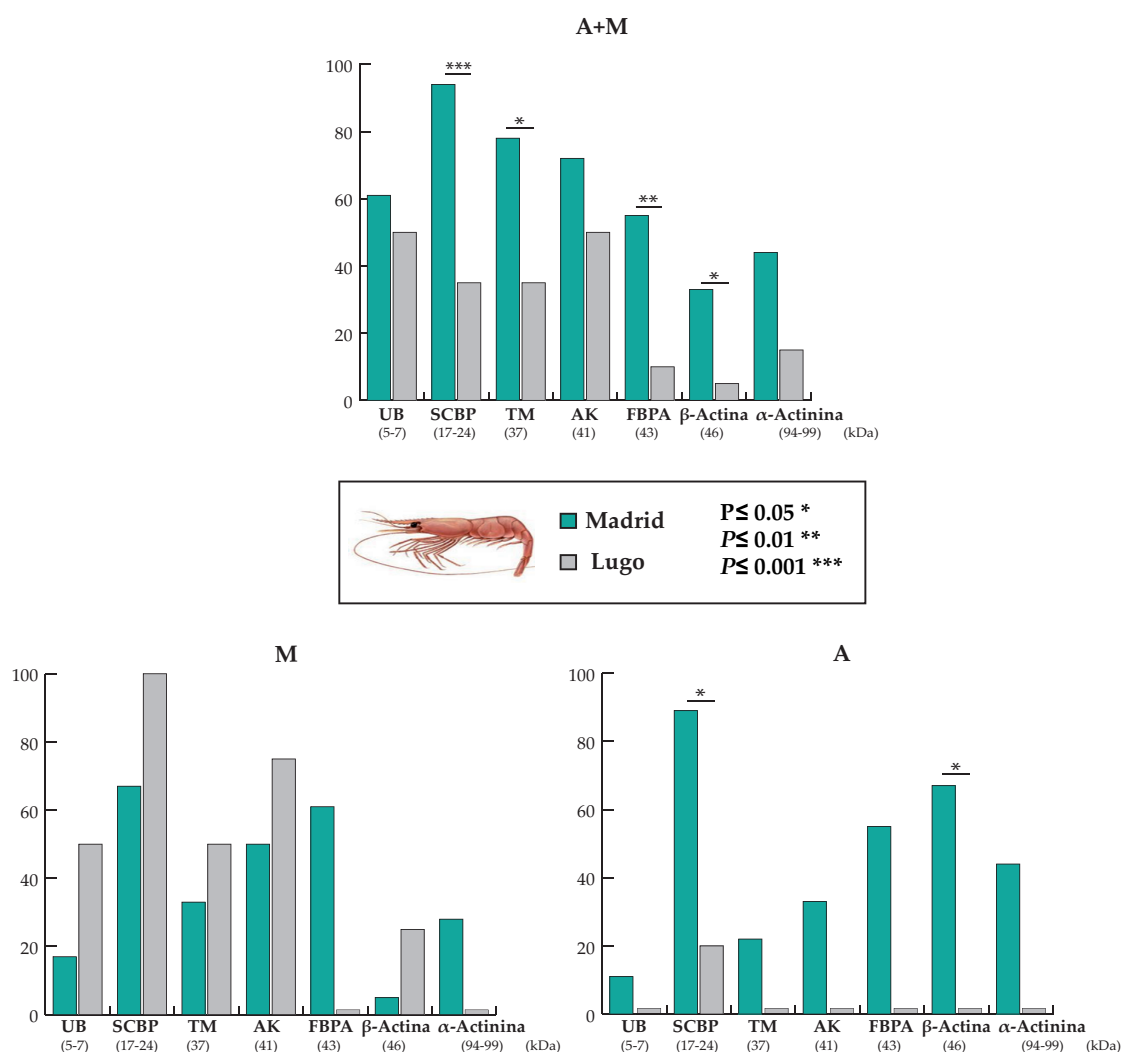


Figura 38. Evaluación de la relevancia de las proteínas identificadas en la gamba *S. melanthero*. En la figura se muestran los porcentajes de reconocimiento de dichas proteínas según los distintos grupos de pacientes (A+M, M y A), encontrándose diferencias significativas entre ambas poblaciones (Madrid vs Lugo), conforme se indica en la figura (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Considerando el grupo A+M de ambas poblaciones, el porcentaje de reconocimiento de la mayoría de las proteínas analizadas es mayor en la población de Madrid que en la de Lugo, alcanzándose diferencias significativas respecto a las proteínas SCBP (17-24 kDa) ($P<0,001$), FBPA ($P<0,01$), TM ($P<0,05$) y β -actina ($P<0,05$).

Al analizar los porcentajes de reconocimiento en el grupo con síntomas sólo a M, los sujetos de Lugo reconocen en mayor proporción las proteínas UB, SCBP, TM, AK y β -actina, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

Respecto al grupo A, la población de Madrid es la única que detecta las bandas en el extracto de la gamba, a excepción de la proteína SCBP que es reconocida también por los individuos del grupo A de Lugo (**Figura 38**). En este grupo las proteínas detectadas significativamente con más frecuencia por la población de Madrid son la β -actina y SCBP ($P<0,05$).

Del análisis de estos datos se puede concluir que los alérgenos del extracto de la gamba identificados como SCBP, TM, AK, FBPA, β -actina y la α -actinina son relevantes para la población de Madrid, mientras que para la población de Lugo tiene mayor importancia el alérgeno de bajo PM, identificado como UB; así como las proteínas SCBP y AK.

Los porcentajes de reconocimiento de las proteínas del extracto del ácaro de PM equivalentes a las proteínas identificadas en el extracto de la gamba se muestran en la **Figura 39**, destacando la banda de 5-7 kDa al ser detectada por un 75% de la población A+M de Lugo, mientras que ningún individuo de este grupo de la población de Madrid lo hace, siendo estas diferencias altamente significativas ($P<0,001$). Sin embargo, este mismo grupo de la población de Madrid presenta mayor porcentaje de reconocimiento de la proteína α -actinina, siendo estas diferencias significativas respecto a la población de Lugo ($P<0,001$) (**Figura 39**).

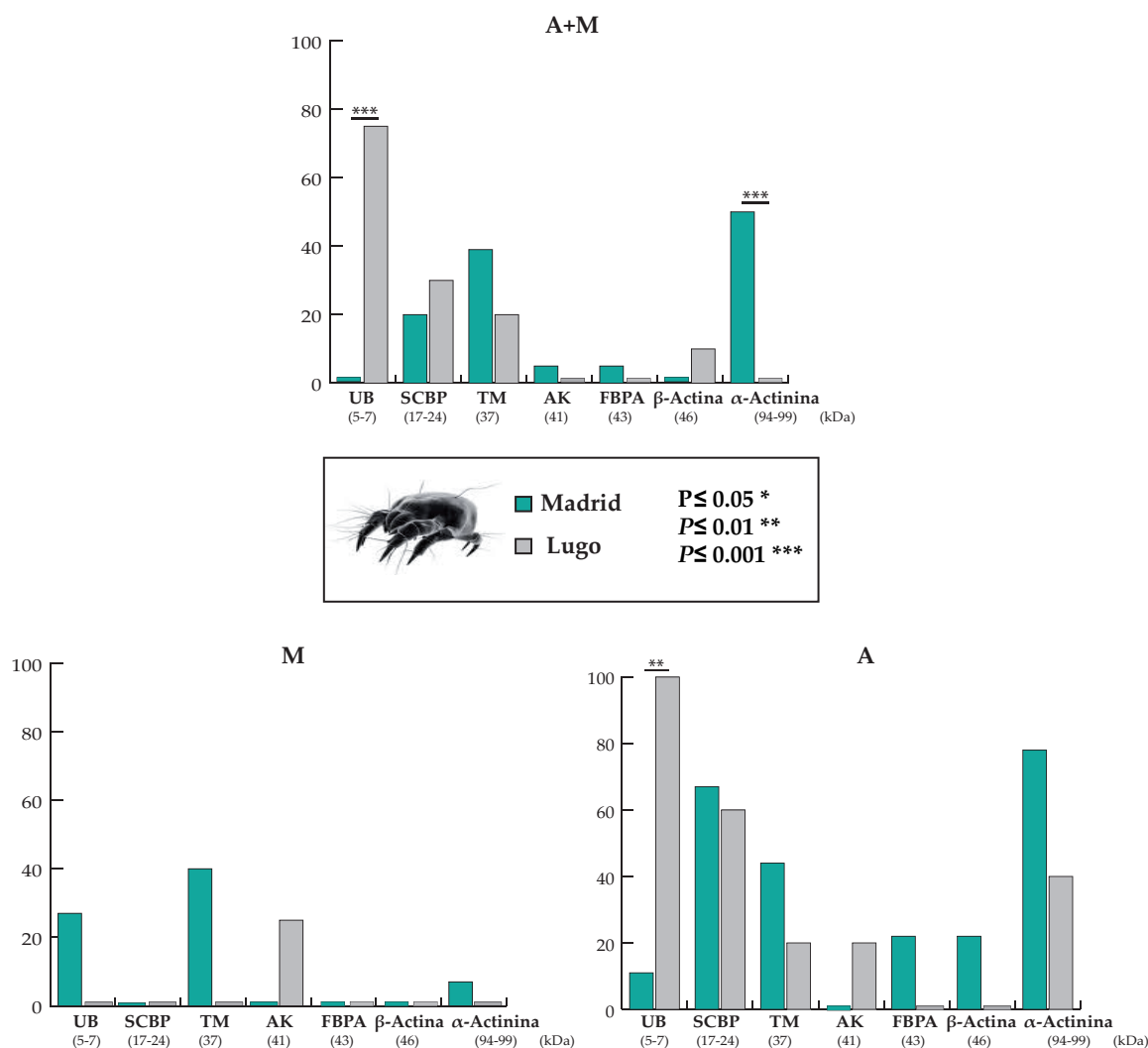


Figura 39. Evaluación de la relevancia de las proteínas del extracto del ácaro *D. pteronyssinus* de PM equivalentes a las proteínas identificadas en la gamba *S. melantho*. En la figura se muestran los porcentajes de reconocimiento de dichas proteínas según los distintos grupos de pacientes (A+M, M y A), encontrándose diferencias significativas entre ambas poblaciones (Madrid vs Lugo), conforme se indica en la figura (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Cuando se comparan los grupos M de ambas poblaciones, las proteínas del extracto del ácaro alcanzan frecuencias de reconocimiento muy bajas. La población de Lugo sólo detecta en mayor proporción que la de Madrid la proteína de 41 kDa, pero sin alcanzar la significación estadística; y en la población de Madrid ocurre lo mismo con las proteínas TM, UB y α -actinina. Destaca el hecho de que ningún individuo del grupo M de Lugo es capaz de detectar la TM del extracto de ácaro, mientras que el 40% de los individuos de este grupo de Madrid la reconocen (**Figura 39**).

No obstante, el grupo A de ambas poblaciones es capaz de detectar en mayor o menor medida las bandas estudiadas. La proteína de 5-7 kDa es reconocida por un mayor porcentaje de individuos de este grupo de Lugo ($P < 0,01$), al igual que la banda de 41 kDa, aunque en este caso no se alcanzan diferencias significativas (**Figura 39**). Respecto al resto de las proteínas, el grupo A de Madrid las detecta en mayor medida, pero sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas (**Figura 39**).

En el ácaro, según estos datos, las bandas más relevantes son las de 37-39 y 94-99 kDa en Madrid, y la de 5-7 kDa en Lugo; y la de 17-24 kDa lo es para el grupo A de ambas poblaciones.

En resumen, según la población estudiada y la sintomatología de la población, la β -actina, TM, FBPA, AK y SCBP, son alérgenos relevantes en el extracto de gamba en la población total de Madrid, mientras que en Lugo lo son la AK, TM, SCBP y UB. Cabe destacar que para los individuos de Madrid con síntomas a A+M también son relevantes la UB (proteína de 5-7 kDa) (61%) y la α -actinina (94-99kda) (44%).

En el extracto de ácaro, la proteína más significativa para la población de Madrid es la proteína de elevado PM α -actinina; y en la población de Lugo lo es la proteína de 5-7 kDa, identificada como UB.

3.4. RELEVANCIA DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EN LA GAMBA *Solenocera melanthero* EN LA REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE GAMBA Y ÁCAROS

Además de comparar ambas poblaciones, también se estudió la relevancia de los alérgenos identificados en la gamba con las proteínas de PM equivalentes en el extracto del ácaro, resaltando ahora las proteínas que no presentaban diferencias significativas entre ambos extractos, ya que esto podría ser indicativo de estar implicadas en la reactividad cruzada entre la gamba y el ácaro.

Tabla IX. Evaluación de la relevancia de la frecuencia de reconocimiento de las proteínas identificadas en la gamba *S. melanthero* y sus equivalentes según el PM en el ácaro *D. pteronyssinus* en la población de Madrid y Lugo.

| | A+M | | | | | |
|--------------------|-------------|------------|---------|-------------|-------------|--------|
| | MADRID | | | LUGO | | |
| | Gamba | Ácaro | P | Gamba | Ácaro | P |
| α -actinina | 44% (8/18) | 50% (9/18) | NS | 15% (3/20) | 0% (0/20) | NS |
| β -actina | 33% (6/18) | 0% (0/18) | <0.05 | 5% (1/20) | 10% (2/20) | NS |
| FBPA | 55% (10/18) | 5% (1/18) | <0.01 | 10% (2/20) | 0% (0/20) | NS |
| AK | 72% (13/18) | 5% (1/18) | <0.0001 | 50% (10/20) | 0% (0/20) | <0.001 |
| TM | 78% (14/18) | 39% (7/18) | NS | 35% (7/20) | 20% (4/20) | NS |
| SCBP | 94% (17/18) | 11% (2/18) | <0.0001 | 35% (7/20) | 30% (6/20) | NS |
| UB | 61% (11/18) | 0% (0/18) | <0.0001 | 50% (10/20) | 75% (15/20) | NS |

Porcentajes de reconocimiento de los pacientes A+M de ambas poblaciones, comparando ambos extractos, encontrándose diferencias significativas o no, según se indica en la tabla.

Casi todos los alérgenos identificados en la gamba *S. melanthero* son mayormente detectados por la población de Madrid en el extracto de la gamba que las proteínas de PM equivalente en el extracto del ácaro (Tabla IX). Entre estas proteínas, la TM junto con la α -actinina no presentaron diferencias estadísticamente significativas en esta población, indicando su posible implicación en la RC entre ambas fuentes alérgicas.

Respecto a la población de Lugo, cabe señalar que las proteínas identificadas como TM, SCBP y UB y sus homólogas de PM equivalentes en el ácaro, no presentaron diferencias significativas entre ambos extractos, destacando la elevada frecuencia de reconocimiento de la UB, tanto en el extracto de la gamba (50%), como en el del ácaro (75%) (**Tabla IX**).

De estos resultados se deduce que la proteína identificada en la gamba *S. melantho* como α -actinina podría ser uno de los responsables de la RC entre la gamba y el ácaro en la población de Madrid, mientras que las proteínas identificadas como UB y SCBP lo serían para la población de Lugo.

4. ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD CRUZADA

La RC entre la gamba y el ácaro es un fenómeno descrito y demostrado desde hace mucho tiempo, pero hasta la fecha solamente se ha identificado a la TM como la proteína responsable de dicha RC.

En los alergogramas frente a ambos extractos se observan numerosas bandas proteicas de PM distinto al de la TM, algunas de las cuales son reconocidas de igual modo tanto en la gamba como en el ácaro, lo cual es indicativo de que otras proteínas podrían estar implicadas en la RC entre estas dos fuentes alergénicas. Así, por ejemplo, las proteínas identificadas como UB, α -actinina y AK, además de la TM, podrían ser responsables de la RC entre ambos extractos.

4.1. REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE LA TROPOMIOSINA DE GAMBA Y ÁCARO

Para determinar si existe RC entre la TM de la gamba *S. melantho* y otras especies de gamba o de ácaro, se realizaron distintos ensayos de inhibición cruzada de la inmunodetección (**Figura 40**). Para estos ensayos se utilizaron las TMs purificadas de la gamba *P. monodon* (nPen m 1) y la recombinante del ácaro *D. pteronyssinus* (rDer p 10), así como un *pool* de sueros de pacientes de Madrid (2, 7, 14, 16).

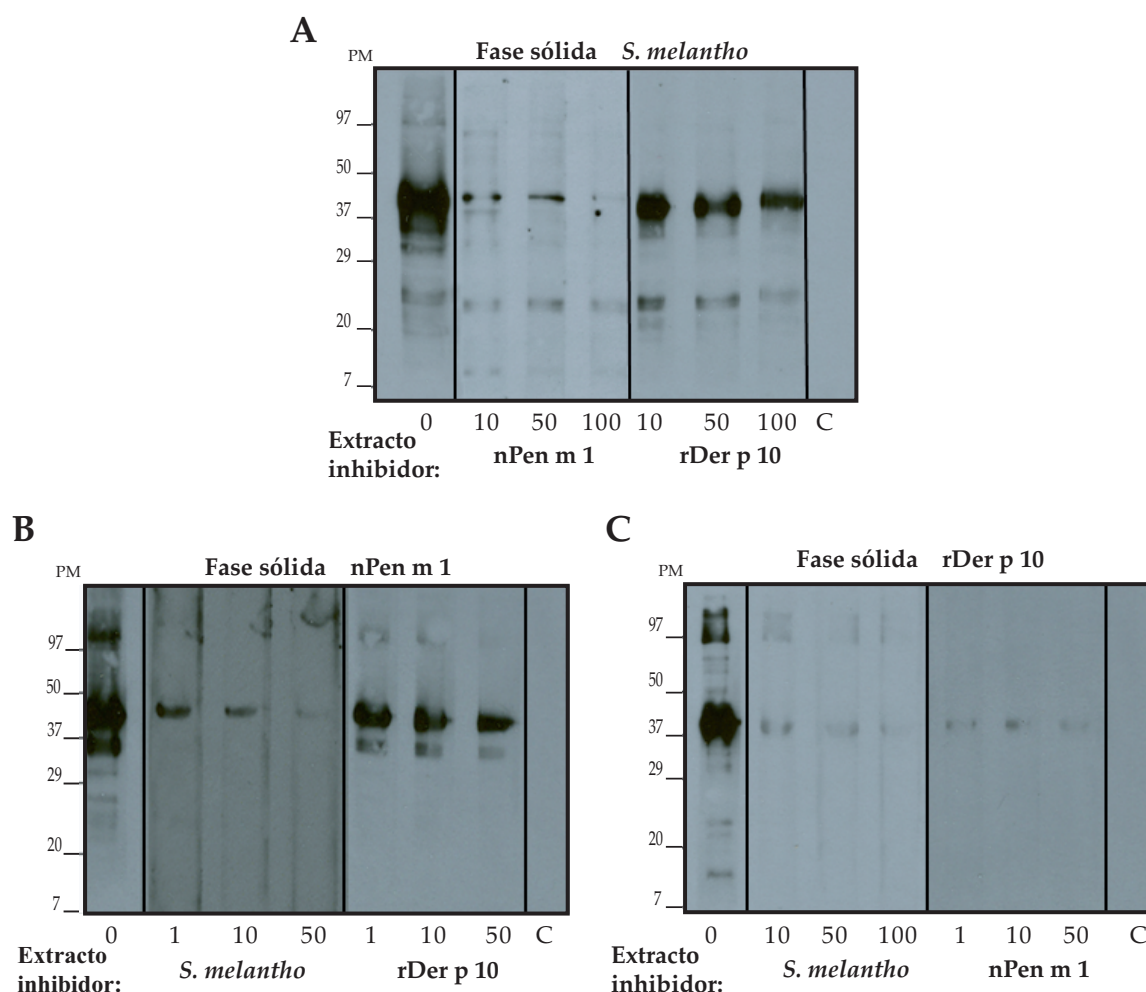


Figura 40. Estudio de inhibición cruzada entre tropomiosinas. (A): Inhibición de la inmunodetección del extracto de *S. melantho* tras pre-incubar el *pool* de sueros de pacientes sensibilizados a gamba, con nPen a 1 o rDer p 10 como proteínas inhibidoras. En fase sólida se separaron las proteínas del extracto completo de *S. melantho* (10 µg/carril). El *pool* de sueros fue incubado con: 100 µg de BSA (carril 0) y con 10, 50 y 100 µg de la proteína inhibidora, nPen m 1 y/o rDer p 10. **(B):** Inhibición de la unión de IgE a nPen m 1 tras pre-incubar el *pool* de sueros de pacientes sensibilizados a gamba con *S. melantho* o rDer p 10 como extracto o proteína inhibidor. En fase sólida se separó la proteína nPen m 1 (2,5 µg/carril). El *pool* de sueros se incubó con: 50 µg de BSA (carril 0) y con 1, 10 y 50 µg de extracto inhibidor. **(C):** Inhibición de la unión de IgE a rDer p 10 tras pre-incubar el *pool* de sueros de pacientes sensibilizados a gamba con *S. melantho* o nPen m 1 como extracto o proteína inhibidor. En fase sólida se separó la proteína rDer p 10 (2,5 µg/carril). El *pool* de sueros se incubó con: 100 µg de BSA (carril 0) y con 1, 10, 50 y 100 µg de extracto inhibidor. Como control negativo se utilizó un *pool* de sueros de sujetos no atópicos (C).

Tras pre-incubar el *pool* de sueros con nPen m 1, se observa que con tan sólo 10 µg se alcanzó una considerable inhibición de la unión de IgE a las proteínas del extracto de *S. melantho*, obteniéndose una inhibición casi completa cuando se emplearon 100 µg de nPen m 1 como extracto inhibidor (95,4%) (**Figura 40A**). Sin embargo, cuando se utilizaron 100 µg de rDer p 10 para inhibir la unión de IgE a las proteínas del extracto completo de la gamba, la inhibición fue tan solo de un 16,6% (**Figura 40A**).

Los ensayos de inhibición cruzada entre el extracto completo y estas TMs purificadas, es decir, empleando ahora como alérgeno inhibidor el extracto completo de gamba, muestran que 50 y 100 µg de extracto inhibidor, producen una inhibición

prácticamente total (99,1 y 99,8%, respectivamente) de la unión de IgE específica frente a nPen m 1 y rDer p 10, respectivamente (**Figuras 40B y 40C**).

Por lo tanto, la RC entre la TM de *S. melantho* y rDer p 10 es asimétrica, dado que se necesitan 100 µg de rDer p 10 para inhibir la unión de IgE a la TM del extracto de *S. melantho*, mientras que la unión de IgE a la TM de este extracto no se consigue inhibir con esta misma cantidad de rDer p 10.

Para inhibir totalmente la unión de IgE a la TM de la gamba *S. melantho*, se requieren 100 µg de nPen m 1 y la mitad del extracto completo de gamba para inhibir la unión de IgE a nPen m 1.

También se realizaron los ensayos de inhibición entre las dos TMs purificadas (**Figuras 40B y 40C**), de modo que cuando el *pool* de sueros se incubó con 50 µg de nPen m 1 se consiguió una inhibición total de la unión de IgE a rDer p 10; incluso con tan sólo 1 µg de nPen m 1 ya se observaba una inhibición casi completa (97,7% inhibición). Sin embargo, cuando el *pool* de sueros se pre-incubó con rDer p 10, tan sólo se alcanzó un 46% de inhibición de la unión de IgE frente a nPen m 1.

Estos resultados nos indican que existe RC asimétrica entre estas dos TMs, siendo la TM de la gamba la responsable de la sensibilización primaria.

4.2. REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE LOS EXTRACTOS DE GAMBA Y ÁCARO

Con el fin de estudiar la RC entre los extractos alergénicos de gamba y ácaro, y de corroborar que las proteínas que no presentan diferencias significativas respecto al porcentaje de reconocimiento en ambos extractos son los alérgenos responsables de la RC entre ambas fuentes alergénicas, se llevaron a cabo diferentes inhibiciones de la inmunodetección con ambos extractos.

Para estos ensayos, dado que previamente se vio que existían diferencias en el perfil alergénico de estos extractos en función de la población estudiada y de la sintomatología que presentaban los pacientes, se usaron diferentes *pools* de sueros.

Además, se realizaron ensayos de inhibición cruzada para intentar establecer que fuente alergénica actuaba como sensibilizante primario.

En la **Figura 41A** se muestra la inhibición de la inmunodetección del extracto de *S. melantho* con *D. pternoyssinus* como extracto inhibidor, utilizando un *pool* de pacientes de Madrid (2, 5 y 7). En el primer carril se observa la inmunodetección de *S. melantho* utilizando el *pool* de sueros sin inhibir. La pre-incubación de dicho *pool* con el extracto de ácaro supuso una pérdida de reconocimiento de las bandas identificadas como UB (5-7 kDa) y α -actinina (94-99 kDa). Mientras que la TM (37-39 kDa) no se inhibía ni con la máxima concentración de extracto inhibidor.

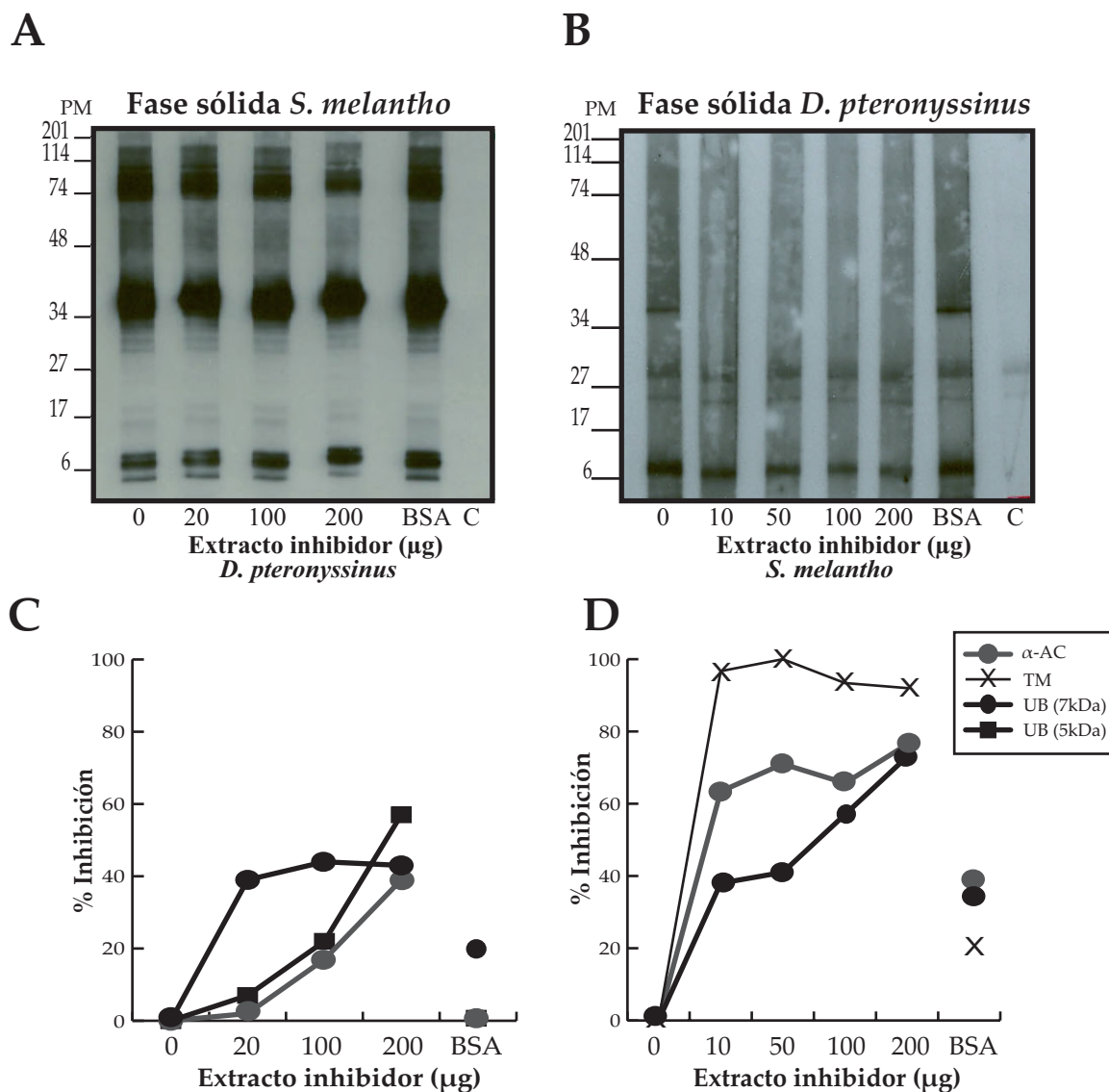


Figura 41. Estudio de inhibición cruzada entre los extractos de gamba *S. melanthero* y el ácaro *D. pteronyssinus* en la población de Madrid. (A): Inhibición de la inmunodetección del extracto de *S. melanthero* tras pre-incubar el pool de sueros de pacientes A+M de Madrid, con el extracto de *D. pteronyssinus* como extracto inhibidor. En fase sólida se separaron las proteínas del extracto completo de *S. melanthero* (10 μ g/carril). Se utilizó un pool de sueros sin inhibir (carril 0) o inhibido con 20, 100 y 200 μ g de *D. pteronyssinus* y con 200 μ g de BSA (carril BSA). (B): Inhibición de la unión de IgE a *D. pteronyssinus* tras pre-incubar el pool de sueros de pacientes A+M de Madrid con *S. melanthero* como extracto inhibidor. En fase sólida se separaron las proteínas del extracto de *D. pteronyssinus* (20 μ g/carril). El pool de sueros se incubó con 200 μ g de BSA y con 10, 50, 100 y 200 μ g de extracto inhibidor. El carril 0 se corresponde con el pool de sueros sin inhibir. Como control negativo se utilizó un pool de sueros de sujetos no atópicos (C). C y D: Representación del porcentaje de inhibición de las bandas relevantes en la inhibición representada en la figura 41A (C) y 41B (D). α -AC: α -actinina.

En el ensayo de inhibición cruzada (**Figura 41B**), el reconocimiento de las proteínas del extracto de ácaro se inhibió considerablemente, de forma dosis dependiente, tras incubarlo con el pool de sueros con el extracto de gamba. Como puede observarse, la pre-incubación del suero de este pool con 10 μ g del extracto de gamba como extracto inhibidor, produjo una inhibición completa de la banda fijadora de IgE de 37-39 kDa en el extracto de ácaro. También se consiguió inhibir la fijación de IgE a las

proteínas de 7 y 94-99 kDa con la máxima concentración de extracto inhibidor (200 µg), no llegando a alcanzarse la completa inhibición.

Estos resultados demostraron la existencia de una RC asimétrica en esta población entre ambos extractos, siendo la gamba la fuente alérgica responsable de la sensibilización primaria.

La inhibición de la inmunodetección del extracto de gamba utilizando un *pool* de sueros de Lugo que sólo detectaban algunas bandas en el extracto de la gamba (1, 7), y el extracto de ácaro como extracto inhibidor, se muestra en la **Figura 42A**. Aquí se observa que este *pool* de sueros sin inhibir sólo presentaba IgE específica capaz de unirse a las bandas proteicas correspondientes con la AK, la TM y la UB (41, 37-39 y 7 kDa, respectivamente). La TM y AK fueron completamente inhibidas con 100 µg de gamba (**Figuras 42A y 42C**). También se consiguió inhibir la unión de IgE a la UB (proteína de 5-7 kDa), pero esta inhibición no llegó a ser completa ni con la máxima cantidad de extracto inhibidor (200 µg) (**Figuras 42A y 42C**).

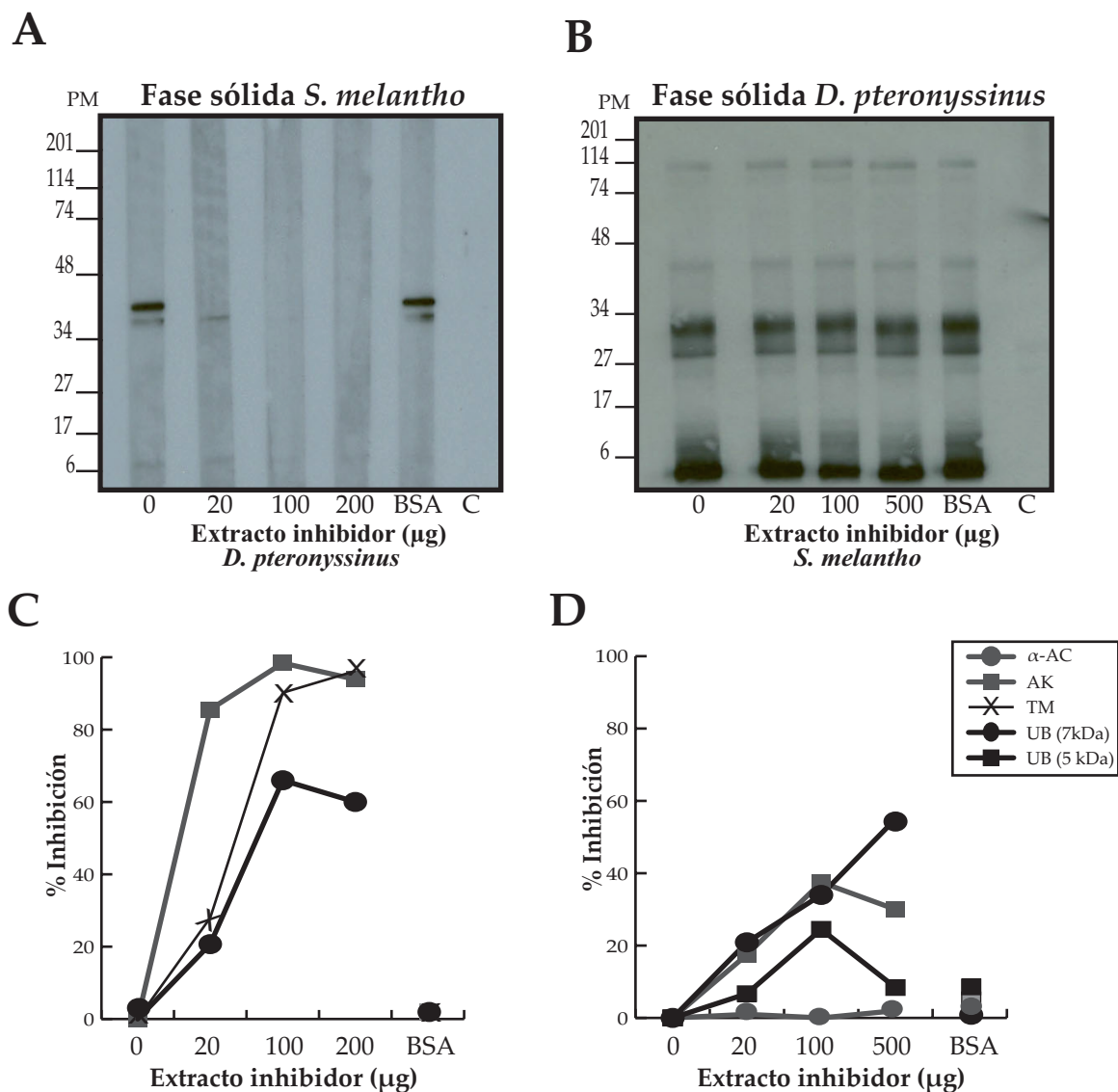


Figura 42. Estudio de inhibición cruzada entre los extractos de gamba *S. melanthero* y el ácaro *D. pteronyssinus* en la población de Lugo que tiene un perfil alergénico frente a *S. melanthero* con reconocimiento de pocas proteínas. **(A):** Inhibición de la inmunodetección del extracto de *S. melanthero* tras pre-incubar el pool de sueros de Lugo, con el extracto de *D. pteronyssinus* como extracto inhibidor. En fase sólida se separaron las proteínas del extracto completo de *S. melanthero* (10 μg /carril). Se utilizó un pool de sueros sin inhibir (carril 0) o inhibido con 20, 100 y 200 μg de *D. pteronyssinus* y con 200 μg de BSA (carril BSA). **(B):** Inhibición de la unión de IgE a *D. pteronyssinus* tras pre-incubar el pool de sueros de Lugo con *S. melanthero* como extracto inhibidor. En fase sólida se separaron las proteínas del extracto de *D. pteronyssinus* (20 μg /carril). El pool de sueros se incubó con 500 μg de BSA y con 20, 100 y 500 μg de extracto inhibidor. El carril 0 se corresponde con el suero sin inhibir. Como control negativo se utilizó un pool de sueros de sujetos no atópicos (C-). **C y D:** Representación del porcentaje de inhibición de las bandas relevantes en la inhibición representada en la figura 42A (C) y 42B (D). α -AC: α -actinina.

Tal como se observa en el estudio de inhibición cruzada (**Figura 42B**), la inmunodetección del extracto de ácaro con este pool de sueros mostraba numerosas bandas proteicas capaces de unir IgE. Cuando se utilizaron 100 μg de extracto de gamba como extracto inhibidor, la detección de las bandas proteicas de 5 y 7 kDa, correspondientes con la UB, y la AK (41 kDa) fue parcialmente inhibida (**Figuras 42B y 42D**).

Los resultados de los ensayos de inhibición obtenidos con este *pool* de sueros, indican que la RC entre ambos extractos es de tipo asimétrico, siendo el ácaro el sensibilizante primario para este tipo de pacientes.

También se llevaron a cabo estos ensayos de inhibición empleando un *pool* de sueros de pacientes de Lugo capaces de detectar numerosas bandas en el extracto de *S. melantho* (23, 24).

La inmunodetección del extracto de gamba con este *pool* (Figura 43A) muestra numerosas bandas capaces de unir IgE y de hacerlo de forma muy intensa sobre todo a las proteínas de alto PM. Cuando este *pool* de sueros se pre-incubó con el extracto de ácaro se consiguió inhibir parcialmente la capacidad de unir IgE de las bandas proteicas de alrededor de 5, 14, 30, 60 y 120 kDa (Figuras 43A y 43C).

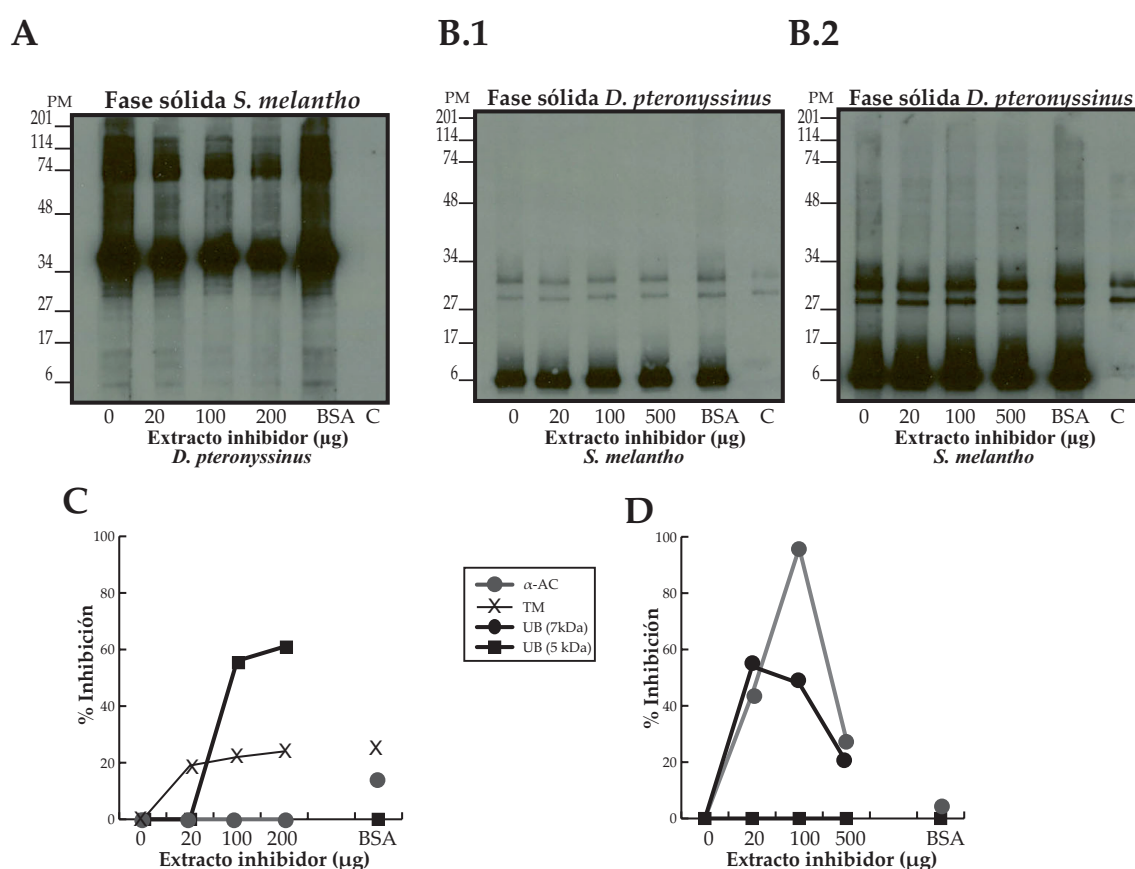


Figura 43. Estudio de inhibición cruzada entre los extractos de gamba *S. melantho* y el ácaro *D. pteronyssinus* en la población de Lugo que tiene un perfil alérgico frente a *S. melantho* con reconocimiento de numerosas proteínas. (A): Inhibición de la inmunodetección del extracto de *S. melantho* tras pre-incubar el *pool* de sueros con el extracto de *D. pteronyssinus* como extracto inhibidor. En fase sólida se separaron las proteínas del extracto completo de *S. melantho* (10 µg/carril). Se utilizó un *pool* de sueros sin inhibir (carril 0) o inhibido con 20, 100 y 200 µg de *D. pteronyssinus* y con 200 µg de BSA (carril BSA). (B): Inhibición de la unión de IgE a *D. pteronyssinus* tras pre-incubar el *pool* de sueros con *S. melantho* como extracto inhibidor. En fase sólida se separaron las proteínas del extracto de *D. pteronyssinus* (20 µg/carril). El *pool* de sueros se incubó con 500 µg de BSA y con 20, 100 y 500 µg de extracto inhibidor. El carril 0 se corresponde con el suero sin inhibir. Diferentes tiempos de exposición de la placa fotográfica: 1 min (B.1) y 10 min (B.2). Como control negativo se utilizó un *pool* de sueros de sujetos no atópicos (C). C y D: Representación del porcentaje de inhibición de las bandas relevantes en la inhibición representada en la figura 43A (C) y 43B (D). α-AC: α-actinina.

En la **Figura 43B** se muestra el ensayo de inhibición cruzada, en el cual se observa el perfil de las bandas proteicas del extracto de ácaro capaces de unir IgE del suero de este *pool* de pacientes (línea 0, **Figura 43B**). Las bandas capaces de unir IgE de este *pool* de sueros son parcial (7 kDa) o totalmente inhibidas (94-99 kDa) cuando se emplean 100 µg de gamba como extracto inhibidor (**Figuras 43B y 43D**).

El porcentaje de inhibición de cada ensayo se representa en las gráficas debajo de cada inmunodetección (**Figuras 41C y 41D; 42C y 42D; y 43C y 43D**). Para ello, la intensidad de la unión de IgE de las bandas proteicas más relevantes en cada ensayo de inhibición se cuantificó por densitometría y se calculó el porcentaje de inhibición asignando el 100% a la intensidad de unión de IgE de la proteína en concreto sin inhibir.

5. APROXIMACIONES EXPERIMENTALES PARA EL DESARROLLO DE UN EXTRACTO HIPOALERGÉNICO DE LA GAMBA

5.1. ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS DEL EXTRACTO DE LA GAMBA MEDIANTE TRATAMIENTO TÉRMICO

Durante la cocción de los alimentos se alcanzan altas temperaturas que pueden romper los puentes disulfuro de las proteínas, alterar su estructura secundaria o terciaria, y por consiguiente, modificar su capacidad de unir IgE, bien eliminando epítomos de unión a IgE, o bien exponiendo estos epítomos y haciéndolos más accesibles [280]. Con el objetivo de estudiar la influencia que el calor ejerce sobre las proteínas de la gamba *S. melantho*, se analizó el perfil proteico y alergénico del extracto cocido de dicha gamba.

5.1.1. PERFIL PROTEICO DE LOS EXTRACTOS DE GAMBA CRUDO, COCIDO Y LÍQUIDO DE COCCIÓN

Con el fin de ver como el calor podía afectar al perfil proteico del extracto de gamba, se prepararon extractos de gamba cocida y del líquido de cocción de dicha gamba para estudiar los alérgenos solubles que se liberan al líquido de cocción. El perfil proteico tanto del extracto crudo (SM), como cocido (SMCo), de la gamba *S. melantho* son prácticamente iguales. Sin embargo en el líquido de cocción (LiCo) se observa que hay menor presencia de proteínas de bajo PM (10 a 20 kDa, aproximadamente) (**Figura 44**).

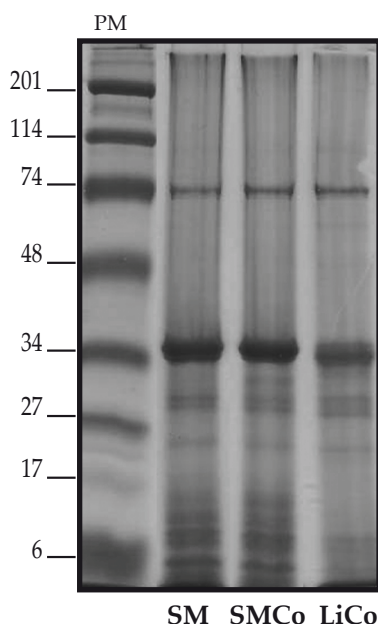


Figura 44. SDS-PAGE del extracto de gamba *S. melantho* crudo (1), cocido (2) y líquido de cocción (3). En cada carril se cargaron 20 µg de cada extracto. En el primer carril se muestran los marcadores de PM (en kDa).

5.1.2. REACTIVIDAD IgE DE LOS EXTRACTOS TRATADOS CON CALOR Y DEL EXTRACTO CRUDO DE GAMBA

Con el objetivo de determinar si las proteínas de los extractos de gamba tratados con calor habían modificado su reactividad IgE respecto al extracto crudo de gamba, se realizaron inmunodetecciones con dichos extractos y con un *pool* de sueros de individuos alérgicos al marisco (2, 5 y 7).

Tal y como se muestra en la **Figura 45**, el ensayo de inmunodetección demostró que la IgE de este *pool* de sueros reaccionaba más intensamente con las proteínas mayores de 48 kDa del extracto SMCo que con las proteínas de PM equivalente del extracto SM. Sin embargo, las proteínas comprendidas en el rango de PM de 5-48 kDa, eran detectadas con la misma intensidad en ambos extractos (**Figura 45**). Las bandas proteicas reconocidas con mayor intensidad por la IgE de este *pool* de sueros fueron las de 7, 30 y 37-39 kDa.

Por el contrario, la reactividad IgE de los sueros de este *pool* respecto al LiCo variaba en comparación con los otros dos extractos (**Figura 45**). En el LiCo se observa una mancha o *smear* de bandas en el rango de 5-25 kDa capaces de unir IgE; y otro en el rango comprendido entre 25-40 kDa. En el LiCo, las bandas reconocidas más intensamente son las de PM ligeramente inferiores a 30 y 37-39 kDa (**Figura 45**).

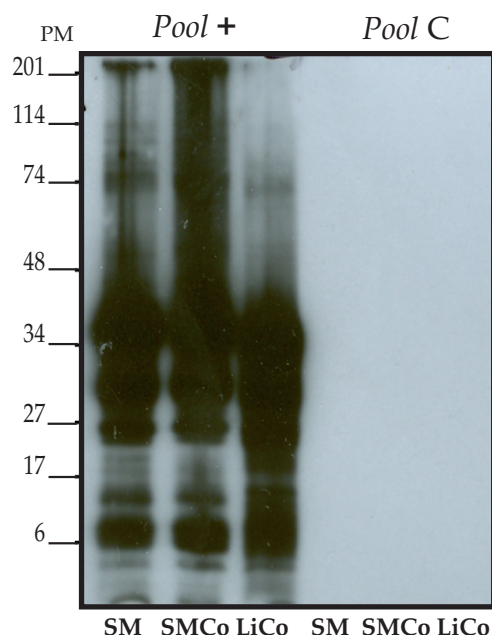


Figura 45. Inmunodetección del extracto de gamba *S. melantho* crudo (SM), cocido (SMCo) y líquido de cocción (LiCo), mediante un *pool* de sueros de pacientes alérgicos a la gamba (*Pool +*). En cada carril se cargaron 20 µg de cada extracto. A la izquierda del gel se muestran los marcadores de PM (en kDa). Se empleó un *pool* de sueros de individuos no atópicos como control negativo (*Pool C*).

Como control se utiliza un *pool* de sueros de sujetos no atópicos, y se constata que éstos no reaccionan frente a ninguna de las proteínas de los extractos de gamba crudo y tratados con calor (Figura 45, *Pool C*).

5.2. ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LOS ALÉRGENOS DEL EXTRACTO DE GAMBA A LA DIGESTIÓN CON PEPSINA

Las proteínas de los alimentos generalmente son degradadas en fragmentos más pequeños durante el proceso de la digestión, pero en algunas ocasiones pueden ser resistentes a las enzimas gástricas y/o intestinales.

Por esta razón, se estudió el efecto de la digestión *in vitro* sobre las proteínas de los extractos completos de la gamba (SM y SMCo) y sobre la TMP utilizando pepsina gástrica como enzima.

Tras determinar la susceptibilidad de las proteínas a ser digeridas, se estudió si los fragmentos generados por esta digestión seguían manteniendo, o no, la capacidad de unir IgE de los sueros de los pacientes alérgicos a gamba.

Además, dado que en la actualidad el consumo de protectores estomacales es elevado, y éstos producen una digestión en un ambiente con pH superior al estándar fisiológico, se analizó la influencia de un aumento de pH en la digestibilidad y la reactividad IgE de los alérgenos de los extractos de la gamba y de la TMP.

5.2.1. DIGESTIÓN *IN VITRO* CON PEPSINA DE LOS EXTRACTOS DE GAMBA CRUDO Y COCIDO

5.2.1.1. ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEICO DE LOS EXTRACTOS DE GAMBA DIGERIDOS CON PEPSINA

El perfil proteico de la gamba *S. melantho* sin tratar con pepsina, tanto del extracto SM (**Figura 46A**) como SMCo (**Figura 46B**), es muy parecido. Además, los perfiles de la digestión de ambos extractos de gamba siguen siendo similares (**Figura 46A y 46B**, SM y SMCo, respectivamente).

Las proteínas de ambos extractos comenzaban a ser degradadas a los 5 min de la digestión, incluso cuando el ratio empleado era el de 0,1 U/ μ g (ratio unidades de pepsina/ μ g de proteína). Al cabo de 60 min de tratamiento con 0,1 U/ μ g, la mayoría de las proteínas de ambos extractos eran degradadas, aunque en el SDS-PAGE aún se observan algunas bandas de aproximadamente 74, 34, 33 10 y 6 kDa. Cuando la digestión se realizó con 10 U/ μ g, a los 60 min, prácticamente la totalidad de las proteínas de ambos extractos eran degradadas en pequeños fragmentos peptídicos de bajo PM, siendo detectables en el SDS-PAGE únicamente las bandas correspondientes a la pepsina (PM=38 kDa) (**Figura 46**).

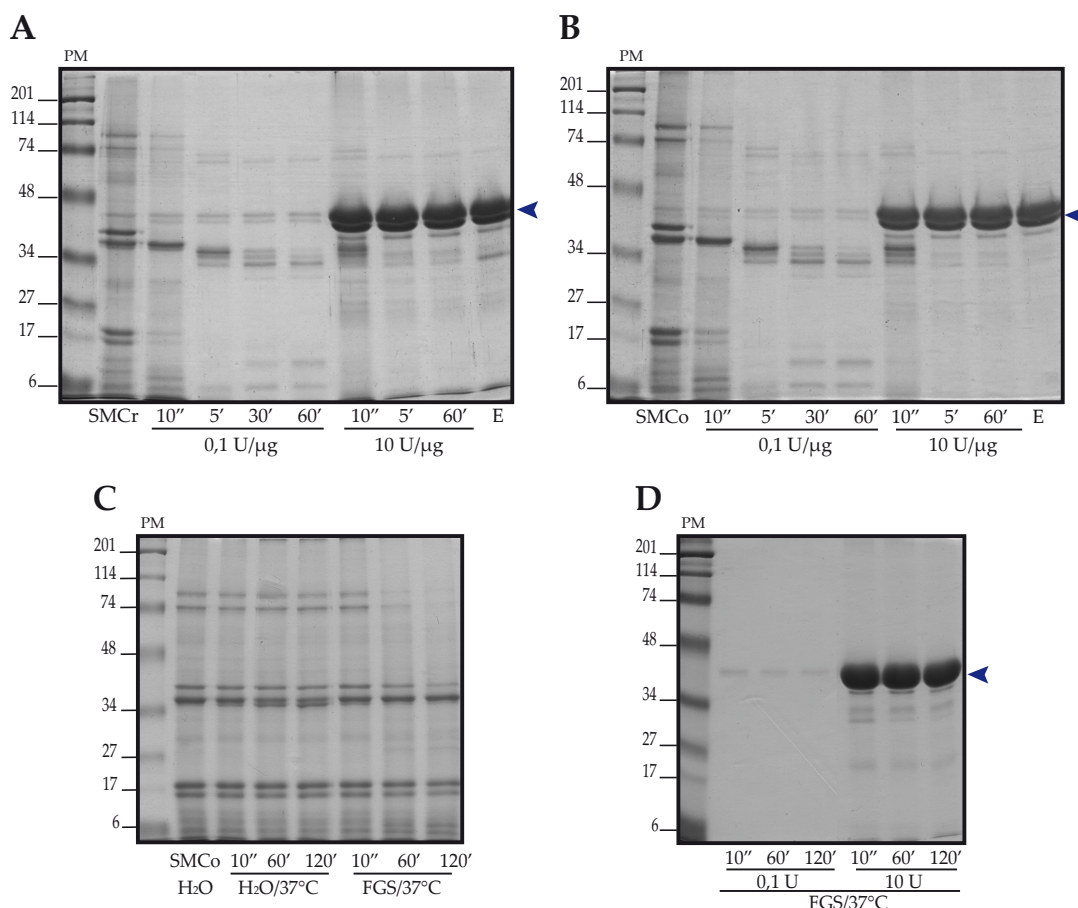


Figura 46. SDS-PAGE del extracto de gamba *S. melantho* crudo (A) y cocido (B) digeridos con pepsina. En el primer carril se muestran los marcadores de PM (en kDa). El perfil proteico de los extractos sin digerir se muestran en el segundo carril. Muestras a distintos tiempos de la digestión con pepsina (10 s, 5, 30 y 60 min) de los extractos digeridos con 0,1 U/μg ó 10 U/μg. E: 10 U de pepsina/60 min sin proteína. (C) SDS-PAGE del extracto de gamba *S. melantho* cocida sin digerir en H₂O/4°C, 37°C y en FGS+P/37°C. (D) SDS-PAGE de los controles 0,1 U y 10 U de pepsina en FGS /37°C sin proteína. Extracto de gamba cocido sin digerir a diferentes tiempos (10 s, 60 y 120 min) según las distintas condiciones control (H₂O/4°C ó 37°C y FGS+P/37°C). En la figura se muestran los perfiles proteicos de muestras obtenidas a diferentes tiempos de la digestión *in vitro*, de la pepsina empleada según el ratio utilizado, pero sin proteína que digerir. La punta de flecha azul indica la pepsina.

En el SDS-PAGE de la **Figura 46C** se observa como el perfil de proteínas del extracto SMCo no se modificaba tras someterlo a 37°C, ni al extremo pH 1,2. Los controles de la pepsina en H₂O_d y/o FGS, es decir, sin añadir proteínas de los extractos de la gamba, se muestran en la **Figura 46D**.

5.2.1.2. ANÁLISIS DE LA REACTIVIDAD IgE DE LAS PROTEÍNAS DE LOS EXTRACTOS DE GAMBA DIGERIDOS CON PEPSINA

Se evaluó la reactividad IgE de las proteínas de los extractos SM y SMCo digeridos y sin tratar con pepsina mediante inmunodetección con un *pool* de sueros de pacientes sensibilizados a gamba.

Respecto a la reactividad IgE del extracto SM (**Figura 47A**), se observó que con el ratio de 0,1 U/μg, las proteínas de alto PM, a medida que aumentaba el tiempo de la

digestión, perdían su capacidad de unir IgE, mientras que los fragmentos proteicos pequeños obtenidos de esta digestión, la aumentaban.

No obstante, cuando el ratio de pepsina y proteína empleado era de 10 U/ μ g, 5 min de digestión eran suficientes para que casi la totalidad de las proteínas obtenidas no reaccionasen con la IgE de este *pool* de sueros, a excepción de los fragmentos de bajo PM, los cuales no eran detectados por la IgE al cabo de 60 min de digestión con dicho ratio.

Cuando el extracto digerido era SMC₀, tanto con 0,1 como con 10 U de pepsina/ μ g de proteína, se observó un perfil de las proteínas capaces de unir IgE del *pool* de sueros (**Figura 47B**) similar al obtenido con el extracto SM digerido (**Figura 47A**).

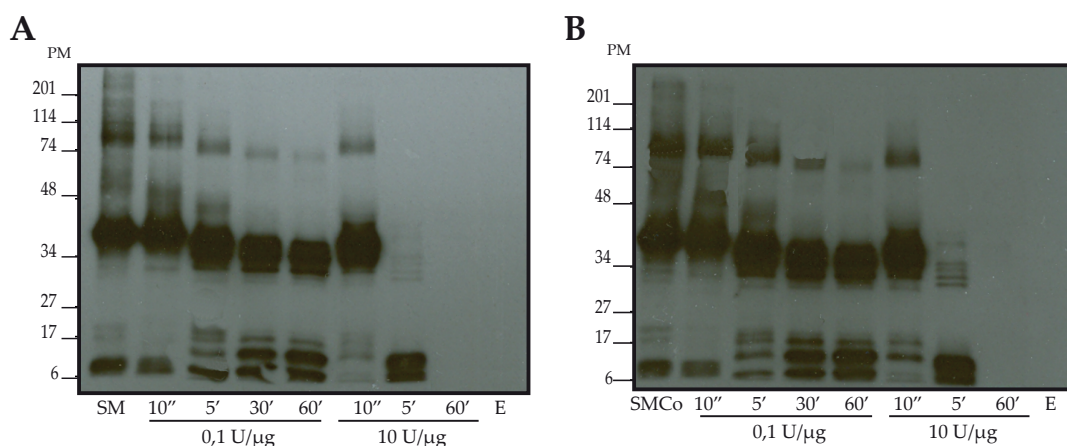


Figura 47. Inmunodetección del extracto de gamba *S. melantho* crudo (A) y cocido (B) digeridos con pepsina. El perfil proteico de los extractos sin digerir (SM, SMC₀) se muestran en el primer carril de cada inmunodetección. Muestras a distintos tiempos de la digestión con pepsina (10 s, 5, 30 y 60 min) de los extractos digeridos con 0,1 U/ μ g ó 10 U/ μ g. E: 10 U de pepsina/60 min sin proteína. Los marcadores de PM (en kDa) se muestran a la izquierda de cada inmunodetección.

En la **Figura 47**, se muestra como el control negativo (FGS+P (10 U/60 min)), no tenía capacidad de unir IgE de ninguno de los *pools* de sueros empleados.

5.2.2. DIGESTIÓN *IN VITRO* CON PEPSINA DE LA TROPOMIOSINA PURIFICADA DE *Solenocera melantho*

5.2.2.1. ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEICO DE LA TROPOMIOSINA PURIFICADA DIGERIDA Y SIN DIGERIR

El tratamiento de digestión *in vitro* de la TMP con distintas cantidades de pepsina produjo diferentes perfiles (**Figura 48**). Así, la TMP, al ser digerida con el ratio 0,1 U/ μ g, resultó ser más estable que cuando era digerida con 10 U/ μ g, incluso tras 60 min de tratamiento, observándose fragmentos proteicos alrededor de 34, 15 y 5 kDa. Sin embargo, cuando el ratio de pepsina/ μ g de proteína empleado era de 10 U/ μ g, la TMP fue digerida completamente antes de los 60 min de tratamiento (**Figura 48**).

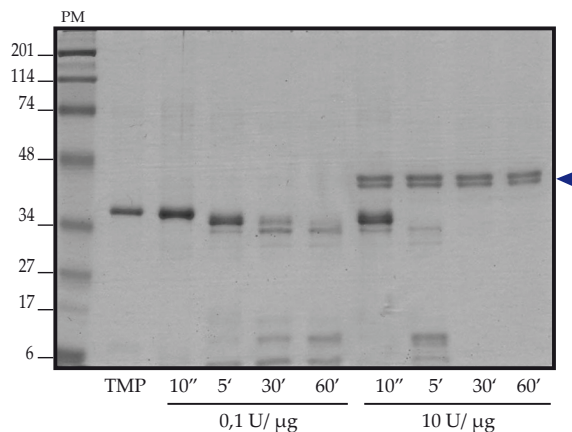


Figura 48. SDS-PAGE de la tropomiosina purificada de la gamba *S. melantho* (TMP) digerida con pepsina. En el primer carril se muestran los marcadores de PM (en kDa). El perfil proteico de la TMP sin digerir se muestra en el segundo carril. Las muestras adquiridas a distintos tiempos de la digestión de la TMP con pepsina (10 s, 5, 30 y 60 min) de los extractos digeridos con 0,1 U/μg ó 10 U/μg se muestran en los carriles 3-6 ó 7-10, respectivamente. La punta de flecha azul indica la pepsina.

El perfil de la TMP en H₂O_d y/o FGS no se modifica tras ser sometida a 37°C, ni a pH 1,2, como puede observarse en el SDS-PAGE de la **Figura 49**.

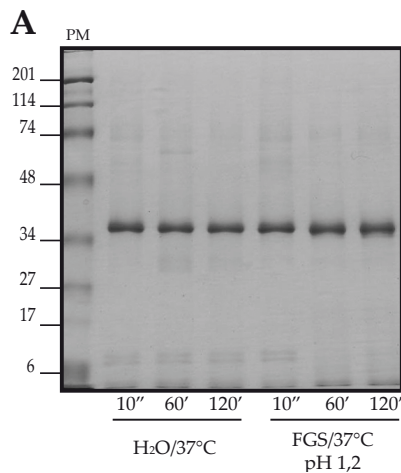


Figura 49. SDS-PAGE de la tropomiosina purificada sin digerir en H₂O_d/4°C, 37°C y en FGS/37°C. En el primer carril se muestran los marcadores de PM (en kDa).

5.2.2.2. ANÁLISIS DE LA REACTIVIDAD IgE DE LA TROPOMIOSINA PURIFICADA DIGERIDA Y SIN DIGERIR

La capacidad de unir IgE de la TMP, tras ser digerida, se analizó mediante inmunodetección usando para ello el suero de un individuo alérgico a la gamba y monosensibilizado a la TM.

En la **Figura 50B** se muestra la reactividad IgE de este suero frente a los extractos de gamba cruda, cocida, y líquido de cocción, comprobando así que este suero, entre todas las proteínas de estos extractos, sólo era capaz de reconocer la TM.

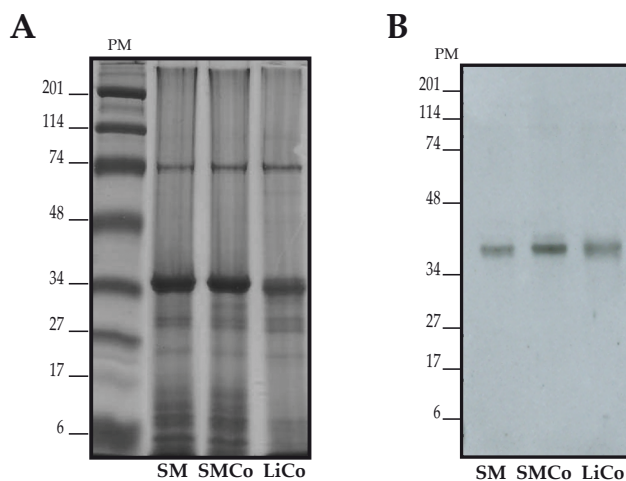


Figura 50. SDS-PAGE (A) e inmunodetección (B) con el suero de un individuo que sólo presenta IgE específica frente a la TM de los extractos crudo (1), cocido (2), líquido de cocción (3) de la gamba *S. melanthero* (20 µg/carril). En el primer carril del SDS-PAGE y a la izquierda de la inmunodetección se muestran los marcadores de PM (en kDa).

El suero de este paciente tenía IgE que reaccionaba con la TMP sin digerir (**Figura 51A**, carril TMP). Esta reactividad IgE se inhibía totalmente cuando la TMP se sometía a 60 min de digestión con pepsina empleando el ratio 0,1 U/µg (**Figura 51A**). Cuando el ratio utilizado era de 10 U/µg, la inhibición de la unión de IgE a la TM digerida fue total a los 5 min de tratamiento (**Figura 51**).

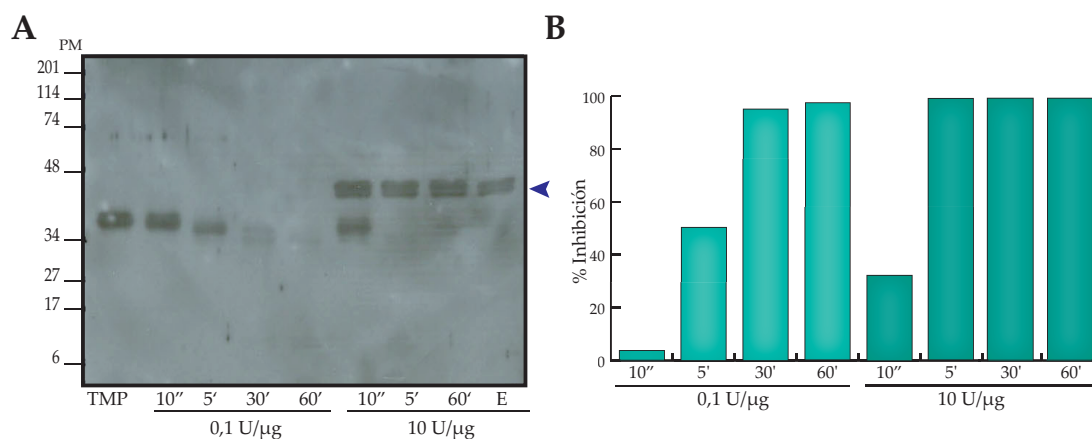


Figura 51. (A) Inmunodetección de la tropomiosina purificada digerida con pepsina. La TMP sin digerir se muestra en el primer carril de las inmunodetección. Muestras a distintos tiempos de la digestión con pepsina (10 s, 5, 30 y 60 min) de los extractos digeridos con 0,1 U/µg ó 10 U/µg. E: 10 U de pepsina/60 min sin proteína. La punta de flecha azul indica la pepsina. PMs (en kDa) (B) Representación de la disminución de la capacidad de la TMP de unir IgE del suero empleado en la inmunodetección. Y: porcentaje de inhibición de la unión de IgE; X: Muestras a diferentes tiempos de la digestión de la TMP con 0,1 U y/o 10 U de pepsina (10 s, 5, 30 y 60 min) por µg de TMP.

El análisis por densitometría confirmó la disminución de la capacidad de unir IgE por parte de la TMP digerida. Como puede observarse en la **Figura 51B**, cuando la TMP se digería con pepsina a 0,1 U/μg durante 60 min, la capacidad de unir IgE desaparecía casi completamente (97,4% de inhibición).

5.2.3. DIGESTIBILIDAD Y REACTIVIDAD IgE DE LAS PROTEÍNAS DEL EXTRACTO DE LA GAMBA *Solenocera melantho* Y DE SU TROPOMIOSINA PURIFICADA, MODIFICANDO EL pH DE LA DIGESTIÓN

5.2.3.1 DIGESTIBILIDAD Y REACTIVIDAD IgE DE LAS PROTEÍNAS DEL EXTRACTO COMPLETO DE GAMBA MODIFICANDO EL pH DE 1,2 A 3,0

El efecto de aumentar el pH de la digestión *in vitro* de 1,2 a 3,0 en el perfil proteico del extracto de gamba se muestra en el SDS-PAGE de la **Figura 52A**.

A los 10 s (**Figura 52A**) de tratamiento con 0,1 U/μg, a pH 3,0 se observa que las bandas proteicas de alrededor de 30 y 20 kDa son más resistentes a ser degradadas por la pepsina que a pH 1,2. Tras 60 min con este tratamiento, casi todas las proteínas del extracto de gamba son degradadas a ambos pHs; apareciendo, sobre todo a pH 1,2, pero de forma tenue, una banda de aproximadamente 33 kDa y otra de 6 kDa.

Cuando el ratio de pepsina/proteína empleado fue 10 U/μg, los perfiles proteicos del extracto de gamba digerido tanto a pH 1,2 como a pH 3,0, a los 10 s presentan las mismas bandas proteicas; mientras que tras 60 min, todas las proteínas de este extracto digerido a ambos pHs, eran degradadas en fragmentos peptídicos tan pequeños que no se detectan en el SDS-PAGE (**Figura 52**).

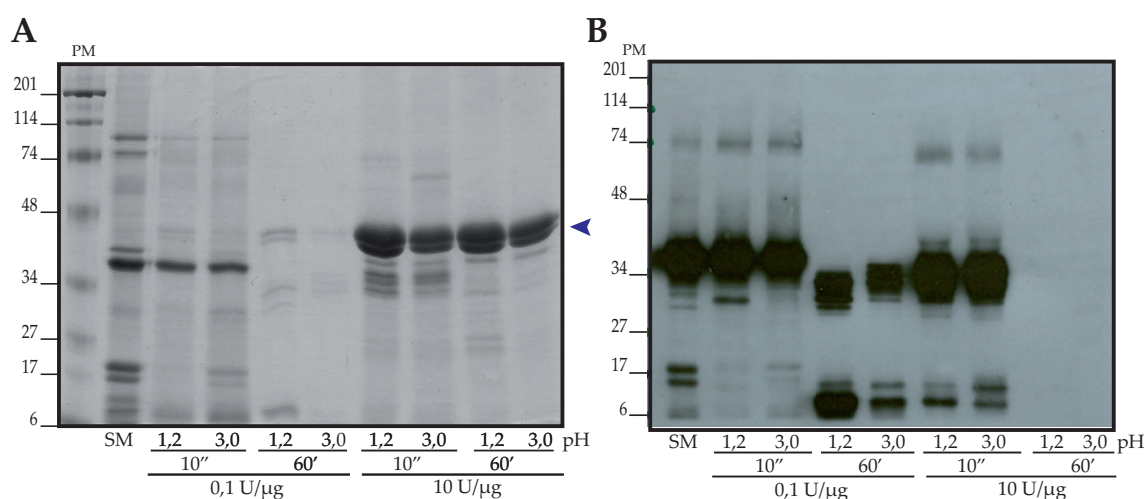


Figura 52. SDS-PAGE (A) e inmunodetección (B) del extracto de la gamba *S. melantho* digerido con pepsina a diferentes pHs. En el primer carril del SDS-PAGE se muestran los marcadores de PM (en kDa). El perfil proteico del extracto sin digerir (SM) se muestran en el segundo carril del SDS-PAGE y primer carril de la inmunodetección. Las muestras digeridas con 0,1 y/o 10 U de pepsina/μg a pH 1,2 y a pH 3,0, y adquiridas a diferentes tiempos (10 s ó 60 min) se muestran en los carriles indicados. La punta de flecha azul señaliza la pepsina.

Para comparar la reactividad IgE frente a las proteínas del extracto de la gamba digerido a distintos pHs, se realizaron inmunodetecciones del extracto digerido a pH 1,2 y 3,0 utilizando un *pool* de sueros de Madrid (**Figura 52B**).

Las mayores diferencias se encontraron tras 60 min de tratamiento con el ratio 0,1 U/ μ g; de tal modo que a pH 3,0 los fragmentos generados eran capaces de unir IgE pero de forma menos intensa que los generados a pH 1,2. No obstante, a los 60 min de digestión con 10 U/ μ g, tanto a pH 1, 2 como pH 3,0, el extracto de gamba no presentaba ningún fragmento proteico capaz de unir IgE (**Figura 52B**).

5.2.3.2. DIGESTIBILIDAD Y REACTIVIDAD IgE DE LA TROPOMIOSINA PURIFICADA MODIFICANDO EL pH DE 1,2 A 3,0

La influencia de la variación del pH en la digestión de la TMP se estudió comparando los perfiles proteicos de la TMP digerida a pH 1,2 y pH 3,0.

La digestión a ambos pHs produjo prácticamente los mismos fragmentos usando los mismos ratios y a los mismos tiempos de tratamiento, como puede observarse en la **Figura 53**.

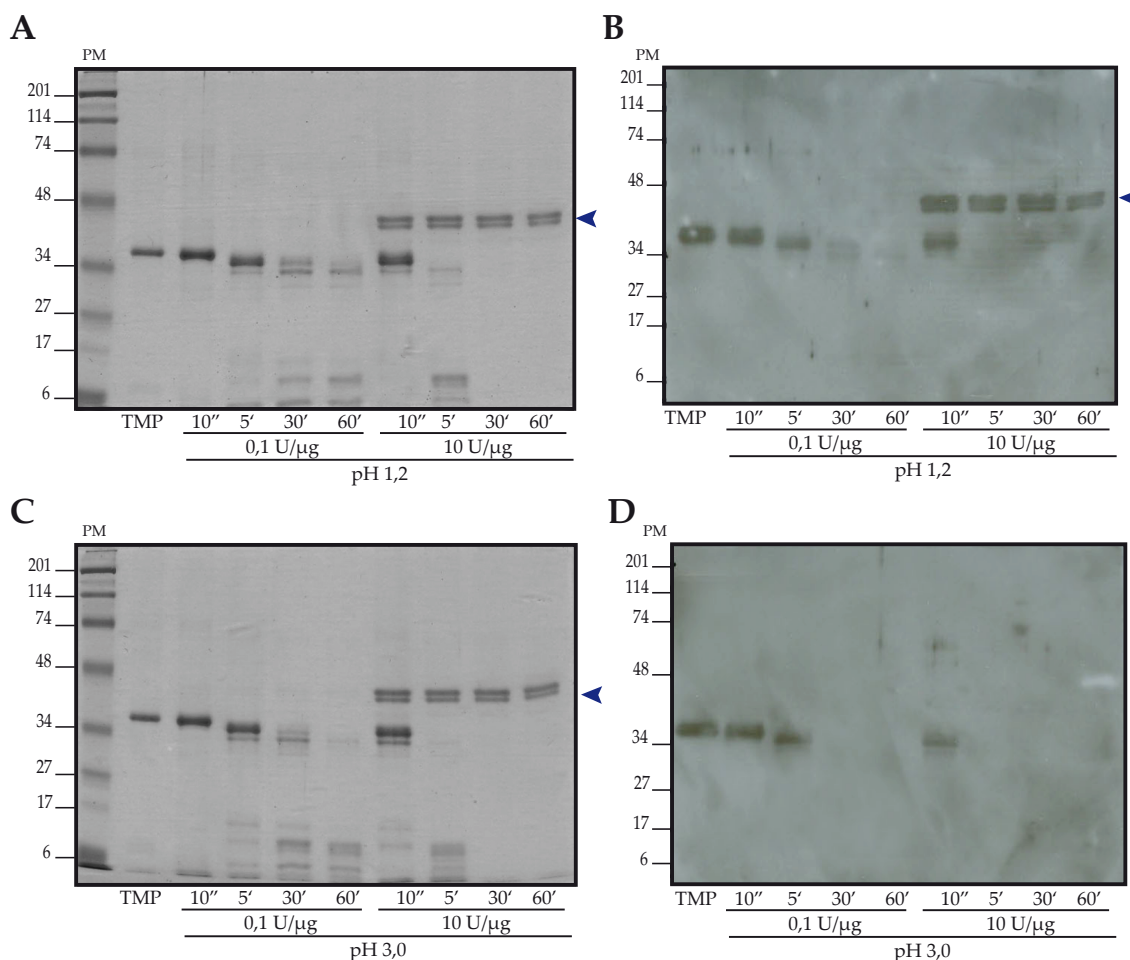


Figura 53. SDS-PAGE (A, C) e inmunodetección (B, D) de la TMP digerida con pepsina a pH 1,2 (A, B) y/o pH 3,0 (C, D). En el primer carril del SDS-PAGE se muestran los marcadores de PM (en kDa). El perfil proteico de la TMP sin digerir (2 μg/carril) se muestra en el primer y segundo carril del SDS-PAGE y la inmunodetección, respectivamente. Las muestras digeridas con 0,1 y/o 10 U de pepsina/μg a pH 1,2 y a pH 3,0, y adquiridas a diferentes tiempos (10 s, 5, 30 y 60 min), se muestran en los carriles indicados. La punta de flecha azul indica la pepsina.

Sin embargo, la capacidad de la TMP de unir IgE del suero del individuo monosensibilizado a la TM se modifica ligeramente en función de si es digerida a pH 1,2 ó 3,0 (**Figuras 53B vs 53D**). La digestión de la TMP con 0,1 U/μg tras 60 min de tratamiento produjo fragmentos proteicos que no eran detectados por la IgE del suero empleado cuando la digestión se realizó a pH 1,2 (**Figura 53B**); mientras que si el pH aumentaba, el mismo resultado se obtenía pero a la mitad de tiempo (**Figura 53D**). Cuando el ratio utilizado es 10 U/μg tan sólo se necesitaron 5 min de tratamiento, tanto a pH 1,2 como pH 3,0, para que ningún producto de la digestión de la TMP presentase reactividad IgE (**Figuras 53B y 53D**, respectivamente).

6. ESTUDIO DEL EXTRACTO COCIDO Y DIGERIDO DE GAMBA COMO EXTRACTO HIPOALERGÉNICO

El extracto cocido de gamba y digerido con 10 U de pepsina por μg de proteína durante 60 min (SMCoD₆₀) no es capaz de unir IgE, como se ha demostrado previamente mediante los ensayos de inmunodetección (apartado 5.2.1.2.).

Con el objetivo de comprobar si SMCoD₆₀ era un buen candidato para ser utilizado como extracto hipoalergénico en el tratamiento de la alergia a la gamba, se realizaron experimentos para demostrar que, además de tener menor reactividad IgE, también poseía menor alergenicidad y mantenía la capacidad inmunogénica.

6.1. REACTIVIDAD IgE

La disminución de la reactividad IgE del extracto SMCoD₆₀ observada mediante las inmunodetecciones, se corroboró mediante ensayos de ELISA de inhibición. En la **Figura 54** puede observarse como 0,07 μg de SMCo eran suficientes para inhibir el 50% de la unión de IgE del *pool* de sueros de pacientes de Madrid (nº 15, 14, 8 y 3), mientras que se requerían 5 μg del SMCoD₆₀ para alcanzar la misma inhibición.

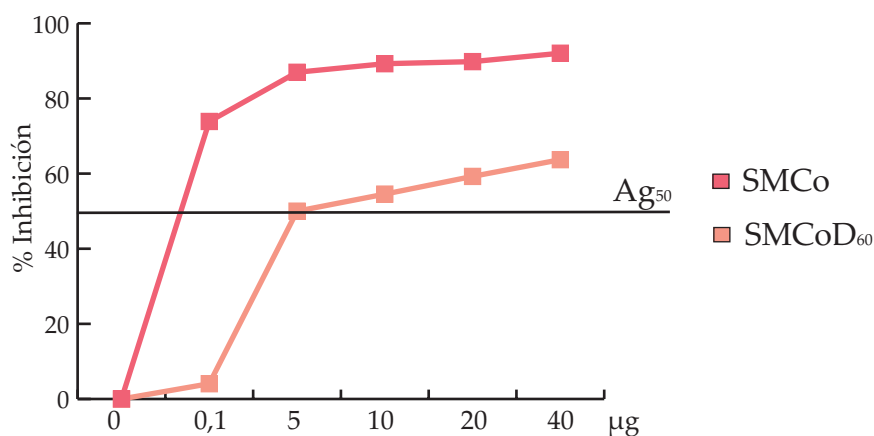


Figura 54. ELISA de Inhibición. Ensayo de inhibición de la unión de IgE de sueros de pacientes alérgicos a la gamba, utilizando como inhibidores los extractos de gamba *S. melanthera* cocida sin digerir (SMCo) y digerido (SMCoD₆₀). En el eje de las ordenadas (Y) se muestra el porcentaje de inhibición de la unión de IgE del *pool* de sueros empleados al inhibirse con los extractos inhibidores. En el eje de las abscisas (X) se indican las cantidades de extracto inhibidor empleadas (0, 0,1, 5, 10, 20 y 40 μg). Ag₅₀ representa la cantidad de extracto inhibidor requerido para producir una inhibición de la fijación de IgE del 50%.

6.2. ALERGENICIDAD DEL EXTRACTO COCIDO Y DIGERIDO DE GAMBA

6.2.1. PRUEBAS CUTÁNEAS CON DIFERENTES EXTRACTOS DE GAMBA

Tras demostrar que el SMC_{CoD}₆₀ tenía menor reactividad IgE, también se quiso comprobar si dicho extracto poseía menor alergenidad mediante pruebas *in vivo*.

Para ello se realizaron pruebas cutáneas con diferentes extractos de gamba en 6 individuos, siendo uno de ellos un control no atópico y no alérgico a la gamba. En la **Figura 55** se muestra un ejemplo representativo de las pápulas obtenidas de las pruebas cutáneas en un sujeto sensibilizado a la gamba y el individuo control.

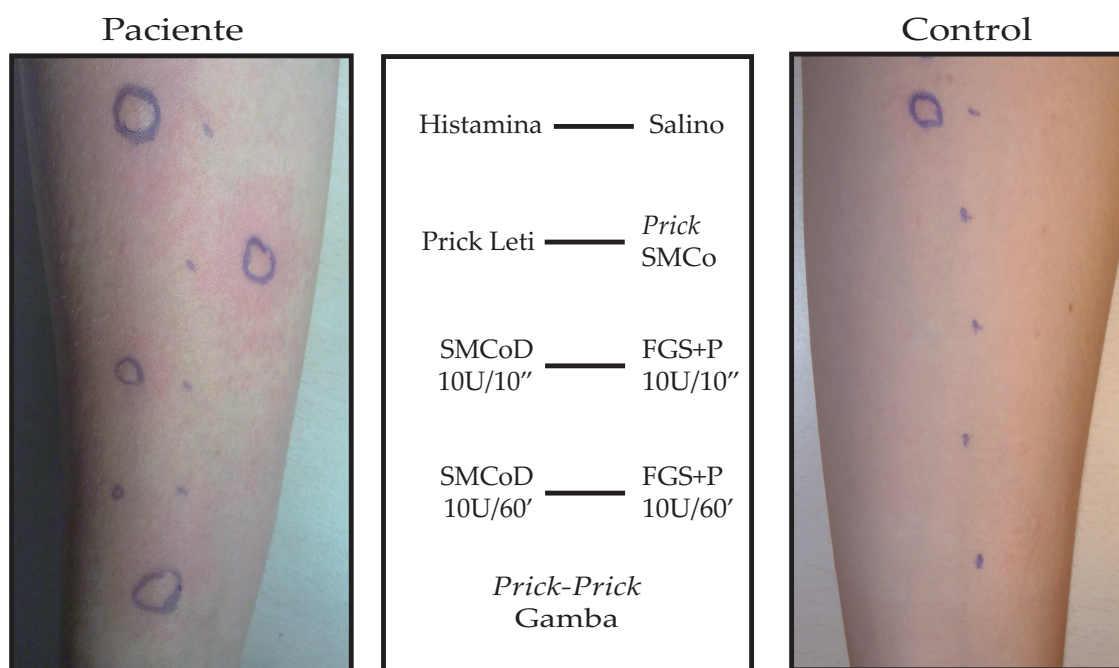


Figura 55. SPT con los diferentes extractos de gamba realizado sobre un sujeto sensibilizado a la gamba (paciente) y un individuo no atópico (control negativo). En el diagrama central de la figura se indican las muestras empleadas además de la posición en la cual han sido aplicadas en el antebrazo de cada individuo. Prick comercial de gamba (Leti), Prick de extracto de gamba *S. melanthero* cocida (Prick SMC_{Co}), extracto gamba *S. melanthero* cocida digerida con el ratio 10 U/ μ g durante 10 s (SMC_{CoD} 10 U/10'') y durante 60 min (SMC_{CoD} 10 U/60'). Como controles negativos de la digestión se utilizaron FGS con pepsina sin proteína a los 10 s del ensayo (FGS+P 10 U/10'') y a los 60 min ((FGS+P 10 U/60'). La histamina y el suero salino se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente, de la prueba SPT. También se realizó SPPT con la gamba *S. melanthero* cruda (Prick-Prick).

En la **Tabla X** se recogen las áreas de las pápulas obtenidas con cada uno de los extractos empleados en cada uno de los sujetos estudiados y las medias \pm SD.

Tabla X. Áreas (mm²) de las pápulas obtenidas mediante SPTs con los diferentes extractos de gamba probados en 5 individuos alérgicos a la gamba y un control negativo (C).

| Sujetos | Histamina | Salino | Extracto Gamba Leti | Extracto Gamba SMC _o | Extracto SMC _o D 10U/10" | Extracto SMC _o D 10U/60' | FGS+P 10U 10" | FGS+P 10U 60' | SPPT |
|----------|-----------|--------|---------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------|---------------|-----------|
| 1 | 33,2 | 0 | 0 | 56,7 | 28,3 | 4,9 | 0 | 0 | 15,9 |
| 2 | 15,9 | 0 | 19,6 | 15,9 | 70,1 | 0 | 0 | 0 | 23,7 |
| 3 | 86,6 | 0 | 0 | 78,5 | 28,3 | 7,1 | 0 | 0 | 95 |
| 4 | 78,5 | 0 | 44,2 | 122,7 | 71 | 86,6 | 0 | 0 | 78,5 |
| 5 | 33,2 | 0 | 63,6 | 33,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50,3 |
| Media±SD | 49,5±31,1 | 0 | 25,5±28 | 61,4±41,6 | 39,5±30,6 | 19,7±37,5 | 0 | 0 | 34,1±34,1 |
| C | 21,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Las medias de las áreas de las pápulas obtenidas con cada extracto junto con su desviación estándar también se muestran en esta tabla (Medias±SD). Extracto de gamba comercial (Leti), extracto de gamba cocida (SMC_o), extracto de gamba cocida digerido con 10 U de pepsina durante 10 s y/o 60 min (SMC_oD 10 U/10" y SMC_oD 10 U/60', respectivamente), 10 U de pepsina en FGS a los 10" y 60' del tratamiento (FGS+P 10 U/10" y FGS+P 10 U/60'), *prick-prick* con la gamba *S. melanthero* cruda (SPPT). La histamina y el salino se emplearon como controles positivo y negativo, respectivamente.

Para determinar si la disminución del área de las pápulas obtenidas con el SMC_oD era estadísticamente significativa, se calculó el porcentaje de reducción del área de las pápulas. Así, el SMC_oD₆₀ produce una pápula con el área significativamente menor que la producida por el SMC_o (82,35±28%, $P<0,05$) (**Figura 56**).

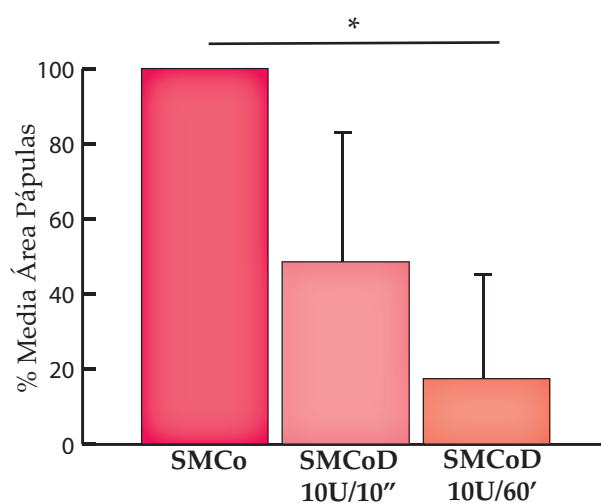


Figura 56. Representación de la disminución del área de las pápulas del extracto de gamba cocido y digerido respecto del extracto de la gamba cocida sin digerir. La media del área de las pápulas obtenidas de los 5 individuos con el extracto de gamba cocida sin digerir (61,4±41,6 mm²) representa el 100%. La media del área de las pápulas obtenidas con el extracto SMC_oD con el ratio 10 U/μg durante aproximadamente 10 s es de 39,5±30,6 mm² (48,8±34%) y durante 60 min de 19,7±37,5 mm² (17,7±28%). El porcentaje que representan las medias de las áreas de las pápulas obtenidas con los extractos empleados en las pruebas SPTs y sus SD se muestran en esta figura.

El control negativo de la técnica, así como los controles negativos del tratamiento de la digestión, es decir, la pepsina sola (FGS+P), no generaban pápula alguna. Destacar que, el extracto comercial de gamba empleado no produjo pápula en dos de los individuos alérgicos probados (**Tabla X**).

6.2.2. TEST DE ACTIVACIÓN DE BASÓFILOS

Los ensayos de activación de basófilos se realizaron con el objetivo de evaluar si la actividad biológica del extracto digerido (SMCoD₆₀) era menor que la del SMCo, respecto de su capacidad de estimular los basófilos y la subsiguiente liberación de mediadores. Estos ensayos se realizaron con la sangre de 3 sujetos sensibilizados a la gamba (nº 2, 3, 4 de la **Tabla X**) y un individuo control no atópico y no alérgico a la gamba (C), utilizando cantidades crecientes de ambos extractos (1-40 µg).

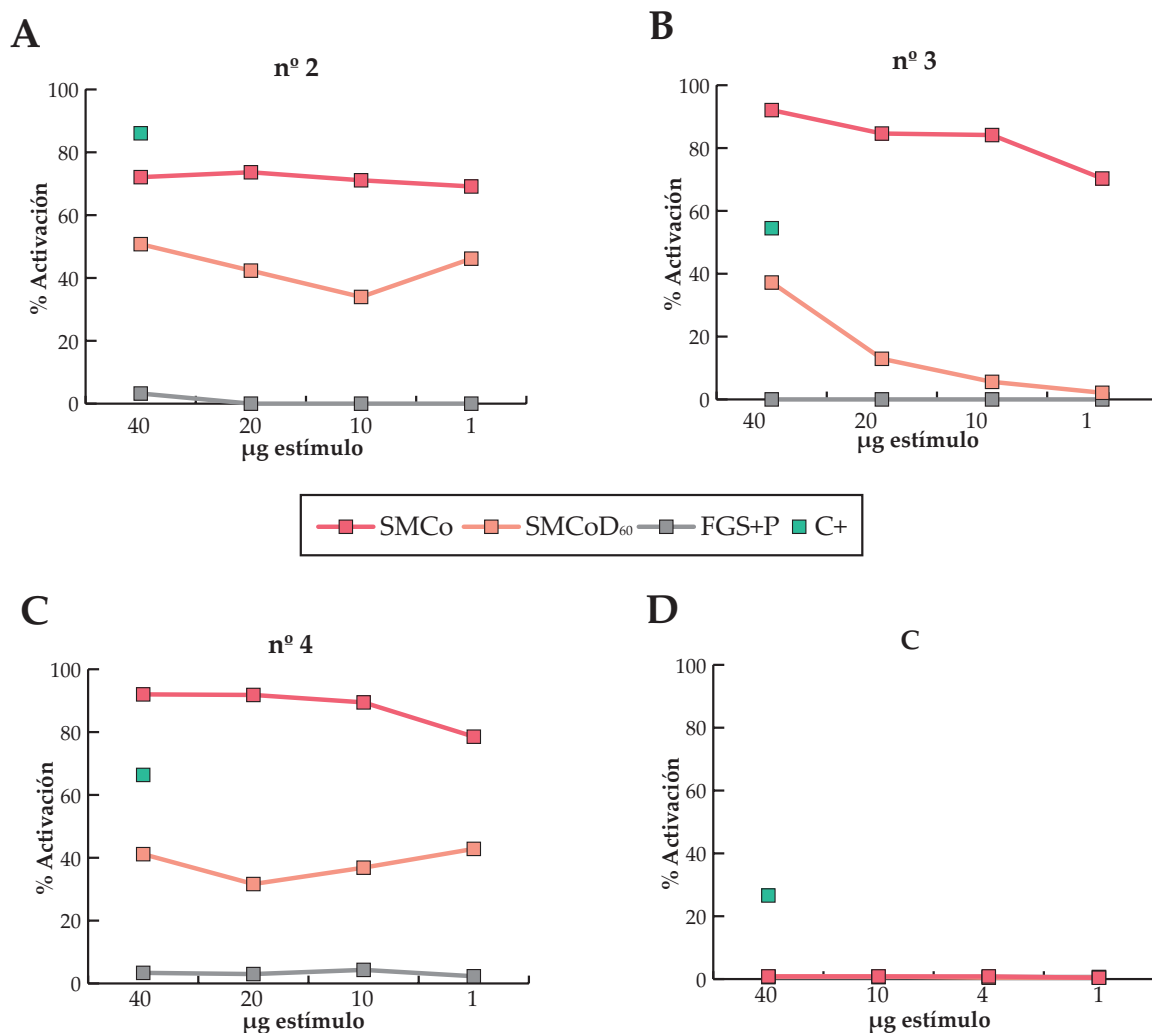


Figura 57. Activación de basófilos inducida por los extractos de la gamba *S. melanthero* cocida sin digerir y digerido. En la figura se representan los porcentajes de activación de los basófilos (ordenadas) de los TABs realizados con la sangre de los 3 individuos sensibilizados a gamba (nº: 2, 3 y 4 de la **tabla X**) y un control negativo (C). Los basófilos fueron estimulados con cantidades crecientes de proteína (abscisas) de los extractos de gamba cocida sin digerir (SMCo) y digerida con 10 U/µg durante 60 min (SMCoD₆₀). También se utilizó como control negativo de la activación el FGS con la pepsina sin proteína tras 60 min del ensayo de digestión *in vitro* (FGS+P). Como control positivo de la técnica se utilizó un control inespecífico de activación (C+).

Cuando la sangre de los sujetos alérgicos se incubó con el extracto SMCo, el porcentaje de activación de basófilos, cuantificado por el aumento de la expresión de CD63, era superior al 50%. Sin embargo, todas las dosis empleadas del extracto SMCoD₆₀ produjeron una activación de basófilos inferior a la obtenida con el extracto SMCo (**Figura 57**). Así, el porcentaje de activación de basófilos a la máxima concentración empleada del extracto SMCo (40 µg) estaba comprendido entre el 71-93%, mientras que para la misma concentración pero del extracto SMCoD₆₀, este porcentaje disminuía a 37-51% (**Figura 57**).

No se detectó expresión de CD63 en los basófilos del individuo no atópico con ninguna de las concentraciones empleadas de ambos extractos (**Figura 57D**).

Además, ninguna de las concentraciones empleadas de FGS+P, produjo activación de los basófilos de los individuos analizados (**Figuras 57A-D**).

Como resultado de comparar las medias de los porcentajes de la expresión de CD63, se observa que, cuando los basófilos se estimularon con SMCoD₆₀, éstos se activaron menos que cuando el estímulo fue el SMCo (**Figura 58**). Esta disminución del porcentaje de basófilos activados se produjo tanto a la máxima (SMCo *vs* SMCoD₆₀ 56,1±41,5 *vs* 37,6±22,2 %) (**Figura 58A**), como a la mínima cantidad de estímulo (SMCo *vs* SMCoD₆₀ 46,6±36,1 *vs* 16,6±23,6 %) (**Figura 58B**).

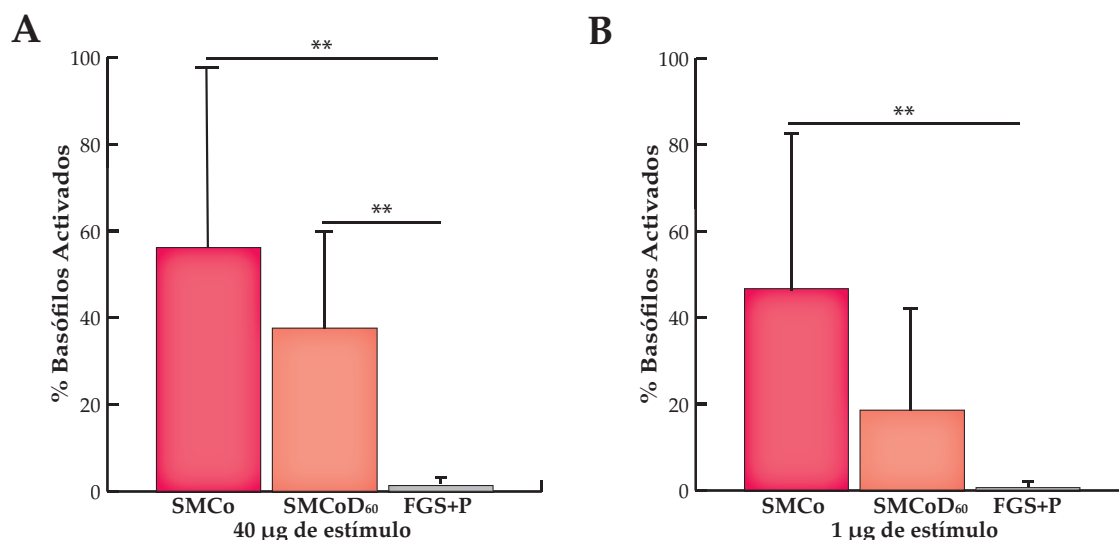


Figura 58. Activación de basófilos inducida por los extractos de la gamba *S. melantho* cocido sin digerir y digerido. En la figura se representan los porcentajes medios de activación de los basófilos (ordenadas) de los TAB realizados con la sangre de los 3 individuos sensibilizados a gamba (nº 2, 3 y 4 de la **Tabla X**), cuando las células son estimuladas con 40 µg (**A**) ó 1 µg (**B**) de los extractos de gamba cocida sin digerir (SMCo), y digerido con 10 U/µg durante 60 min (SMCoD). Como control negativo de la activación se utilizó el FGS con la pepsina sin proteína tras 60 min del ensayo de digestión *in vitro* (FGS+P).

Se utilizó el FGS+P como control negativo del ensayo, y se observó que no producía activación de basófilos a ninguna de las concentraciones empleadas.

6.3. CAPACIDAD INMUNOGÉNICA DEL EXTRACTO COCIDO Y DIGERIDO DE GAMBA

Un extracto hipoalergénico, para poder utilizarlo como tratamiento efectivo y seguro de la alergia, debe cumplir una serie de requisitos. Así, además de la disminución de los epítomos B, también debe conservar los epítomos T para poder inducir un efecto inmunomodulador.

Demostrado mediante pruebas *in vivo* y *ex vivo* que el SMCoD₆₀ tiene menor capacidad de unir IgE del suero de los pacientes y menor actividad biológica alérgica, se estudió si las proteínas de este extracto conservaban los epítomos de las células T, además de conservar su capacidad inmunogénica.

6.3.1. PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T

Con el fin de analizar si las proteínas del SMCoD₆₀ conservaban los epítomos T, se realizaron ensayos de proliferación *in vitro* a partir de las PBMCs purificadas de la sangre periférica de pacientes sensibilizados a la gamba y un individuo control no atópico.

Cuando las PBMCs de 3 individuos sensibilizados a la gamba se incubaron con 100 µg de estímulo, se observó que el SMCoD₆₀ inducía niveles de proliferación comparables a los obtenidos con el extracto SMCo (Figura 59).

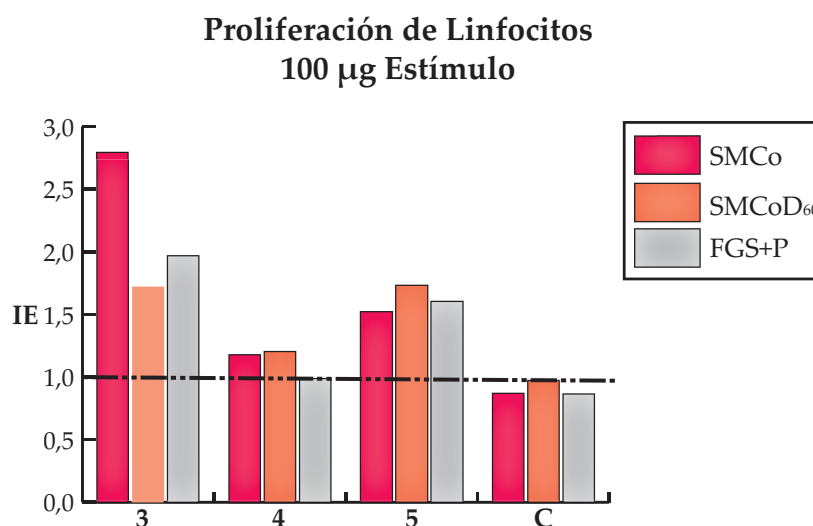


Figura 59. Proliferación de linfocitos T estimulados con el extracto de la gamba *S. melantho* cocido sin digerir y digerido. En la figura se representan los índices de estimulación (IE) (ordenadas) de las PBMCs purificadas de la sangre de diferentes individuos sensibilizados a gamba (nº 3, 4 y 5 de la **Tabla X**) y de un individuo control no atópico (C). Las PBMCs se incubaron con 100 µg de estímulo. Se utilizaron como estímulos el extracto de gamba cocido sin digerir (SMCo) y digerido (SMCoD₆₀), así como el FGS con pepsina sin proteína (FGS+P) como control negativo.

Como control positivo se utilizó PHA (5 µg), alcanzándose índices de estimulación superiores a 3, tanto en los pacientes, como en el control.

6.3.2. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IgG CON CAPACIDAD BLOQUEANTE

6.3.2.1. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS IgG EN CONEJOS

La producción de anticuerpos IgG inducida por la inmunización de conejos con los extractos de gamba (SMCo y SMCoD₆₀) se comparó mediante ELISA a título final (Figura 60).

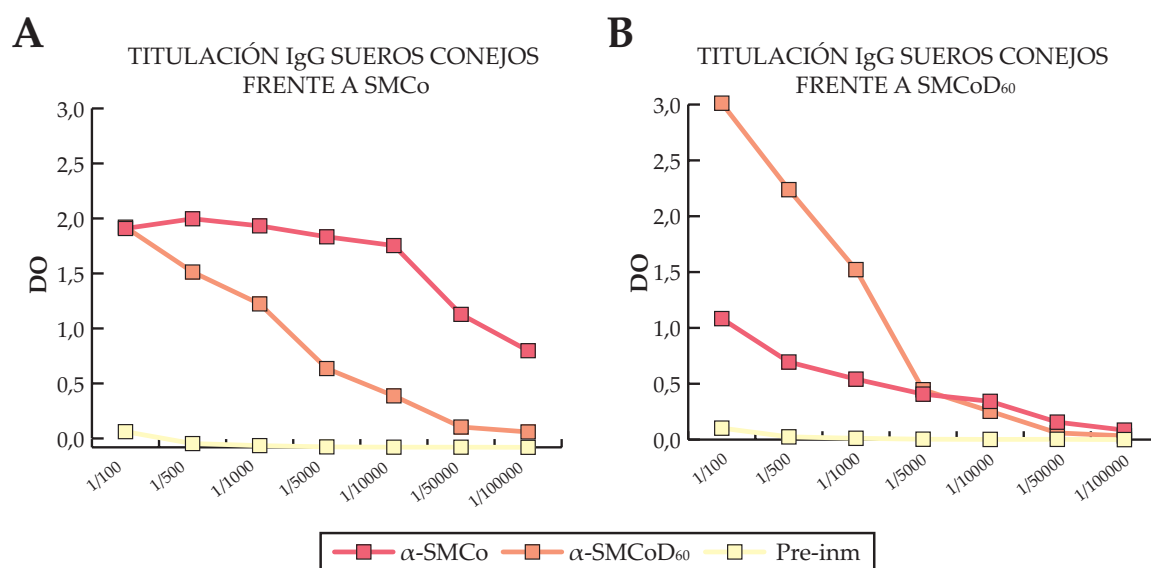


Figura 60. Titulación de los sueros de los conejos inmunizados frente al extracto cocido sin digerir (A) y digerido (B) de la gamba *S. melantho*. Los niveles de IgG se cuantificaron mediante ELISA, midiéndose la absorbancia a 590 nm (DO) (ordenadas) obtenida con distintas diluciones (abscisas) de los sueros de estos conejos. Suero del conejo inmunizado con el extracto de gamba cocida sin digerir (α -SMCo) y digerido con 10 U de pepsina durante 60 min (α -SMCoD₆₀). También se utilizó el suero de los conejos pre-inmunizados como control negativo de la inmunización (pre-inm).

El título frente al extracto SMCo (Figura 60A) fue mayor para el suero del conejo inmunizado con el extracto SMCo (anti-SMCo), mientras que, como cabía esperar, en la titulación frente al extracto SMCoD₆₀ (Figura 60B), el conejo inmunizado con el extracto SMCoD₆₀ (anti-SMCoD₆₀) tenía un mayor título de anticuerpos IgG que el suero del conejo anti-SMCo.

La especificidad de los anticuerpos IgG detectados en este ensayo se demuestra por la falta de reactividad del suero de los conejos pre-inmunizados (Figura 60).

6.3.2.2. CAPACIDAD BLOQUEANTE DE LOS ANTICUERPOS IgG DE LOS SUEROS DE LOS CONEJOS

Con el objetivo de estudiar si los anticuerpos IgG anti-SMCo y anti-SMCoD₆₀ generados por los conejos inmunizados tenían capacidad bloqueante que inhibiese la unión de las proteínas de la gamba a la IgE del suero de los pacientes, se realizaron ELISAs de competición con los sueros de 14 individuos sensibilizados a gamba.

La pre-incubación de las proteínas de la gamba cocida con los anticuerpos IgG anti-SMCo, produjo una inhibición de la unión de la IgE de los sueros de los pacientes comprendida entre 46-100%, con una media de $87,5 \pm 21\%$ (Tabla XI).

Tabla XI. Inhibición de la unión de la IgE de los pacientes a las proteínas del extracto de gamba cocida mediante los anticuerpos IgG de los sueros de los conejos inmunizados.

| Pcte. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | Media \pm SD |
|-------------------------------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|------|------|-------------------|
| α -SMCo | 100a | 100 | 100 | 66,5 | 55,3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 46 | 100 | 56,8 | 100 | $87,5 \pm 21$ |
| α -SMCoD ₆₀ | 11,6 | 7,5 | 16,5 | 6 | 5,2 | 11,7 | 34,3 | 33,4 | 58,3 | 48,1 | 4,9 | 85 | 8,9 | 29,3 | $25,8 \pm 24$ |

Sueros de conejos inmunizados con el extracto de gamba cocida (α -SMCo) o de gamba cocida digerida (α -SMCoD₆₀). En la tabla se indica la media de los porcentajes de inhibición (Media \pm SD) de los 14 pacientes (Pcte.). a: % Inhibición.

Cuando las proteínas del SMCo se incubaron previamente con el suero del conejo anti-SMCoD₆₀, la inhibición de la unión de IgE de los sueros de los pacientes a las proteínas del SMCo alcanzó niveles del 4,9% a 85% de inhibición, siendo la media de $25,8 \pm 24\%$ (Tabla XI).

Este ensayo demostró que ambos extractos son capaces de inducir anticuerpos IgG que bloquean la unión de IgE de los sueros de los pacientes a las proteínas del extracto de gamba, aunque el SMCoD₆₀ lo hacía en menor medida.

DISCUSIÓN

La alergia, enfermedad de carácter complejo y multifactorial, constituye una de las patologías de mayor incidencia y prevalencia en los países desarrollados, afectando casi a un tercio de la población [13, 14, 203].

Dentro de las alergias, una de las más relevantes es la alergia alimentaria, siendo una enfermedad frecuente cuya incidencia ha aumentado durante los últimos años [15] y que conlleva una disminución en la calidad de vida del paciente.

La caracterización de nuevas fuentes alergénicas, así como la identificación de sus alérgenos y su posible implicación en la RC con otras fuentes alergénicas próximas o alejadas filogenéticamente, es de vital importancia para poder lograr tanto una mejora en el diagnóstico de la enfermedad, como una terapia adecuada.

Actualmente, el tratamiento más extendido y eficaz para el control de la alergia alimentaria es evitar el alimento causante de la alergia, aunque también se están desarrollando protocolos de desensibilización con algunos alimentos que están resultando efectivos [204-206], aunque todavía no están totalmente estandarizados y presentan ciertas limitaciones.

Por todo ello, en este estudio se ha planteado identificar las proteínas alergénicas de la especie de gamba *S. melanthero*, así como su implicación en la RC con los ácaros. Además se ha obtenido un extracto hipoalergénico, demostrando su prometedora capacidad para ser empleado como tratamiento de la alergia alimentaria a gamba.

El diseño del estudio ha comprendido seis fases:

1ª. Caracterización de la población de estudio, demográfica y clínicamente.

2ª. Caracterización de los alérgenos de la gamba *S. melanthero*, identificándose siete de sus alérgenos.

3ª. Estudio comparativo de los alergogramas de dos poblaciones procedentes de localizaciones geográficas con climas diferentes (Madrid *vs* Lugo)

4ª. Estudio de la RC entre la gamba *S. melanthero* y el ácaro *D. pteronyssinus*, así como la implicación de las proteínas identificadas en dicha RC.

5ª. Desarrollo de diferentes aproximaciones (tratamiento con calor o tratamiento con pepsina), con el fin de obtener un extracto hipoalergénico.

6ª. Estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, para confirmar que el extracto hipoalergénico obtenido cumplía las características adecuadas para ser utilizado como tratamiento eficaz de la alergia alimentaria a gamba.

1. ALERGIA AL MARISCO

1.1. PREVALENCIA Y CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

El marisco es uno de los agentes causales más frecuentes de las reacciones alérgicas por alimentos. En la actualidad, la prevalencia de la alergia al marisco no se conoce con exactitud, dado que depende de múltiples factores que normalmente no se tienen en cuenta. Los estudios publicados han sido realizados siguiendo diferentes metodologías, y en muestras poblacionales procedentes de distintos países del mundo, de modo que los resultados obtenidos son muy variables y difícilmente comparables, oscilando dicha prevalencia entre el 0,1 y el 4,9% [143-146].

En España, según Alergológica 2005 [15], entre los pacientes atendidos en la consulta del alergólogo, el número de pacientes con alergia al marisco es el único que ha aumentado considerablemente en los últimos años (del 8% en 1992 hasta el 22% en el 2005); siendo los crustáceos los responsables del 85% de la alergia causada por marisco. Este aumento puede explicarse por diversos motivos tales como, un mayor conocimiento de la enfermedad, la mejora de las pruebas diagnósticas o los cambios de hábitos alimenticios, entre otros.

La alergia al marisco es un desorden de larga duración, que puede persistir durante toda la vida, en el cual la gamba es la responsable de la mayoría de las reacciones alérgicas [145]. Existen estudios que afirman que el 85% de los niños con alergia alimentaria durante los 3 primeros años de vida, pierden la sensibilidad a la mayoría de los alimentos con mayor potencial alergénico, entre ellos el huevo, la leche, el trigo y la soja [207, 208]. Sin embargo, la alergia a cacahuete, frutos secos, pescados y mariscos es más duradera [207-209], pudiendo persistir a lo largo de toda la vida del paciente.

El marisco es el responsable de la mayoría de las visitas a urgencias de adultos con alergia alimentaria y para un número significativo de niños de ≥ 6 años [210-212]. Si bien, dependiendo de los hábitos locales (por ejemplo, en Japón), el marisco también puede ser una causa significativa de las reacciones alérgicas en niños de 1 a 5 años [213].

En España, más del 90% de las alergias a marisco se diagnostican en individuos mayores de 15 años [15]. Sin embargo, Ayuso y cols. [154], en una población procedente de diferentes localizaciones (Madrid, Canarias y Nueva York), demuestran que entre los niños y adultos estudiados existen diferencias significativas respecto a la frecuencia de reconocimiento de los alérgenos de la gamba, siendo dicha frecuencia alrededor de dos veces superior en los niños para la mayoría de las proteínas estudiadas (TM, MLC, AK y SCP). Estos autores sugieren que la alergia al marisco desaparece con la edad, y aunque no se conoce el mecanismo por el cual esto ocurre, sería interesante conocer dicho mecanismo para el desarrollo de un tratamiento basado en la tolerancia.

Entre la población estudiada de Madrid, la mayoría de los individuos eran adultos (62%) con una media de $33,1 \pm 8,4$ años; el resto (38%) eran niños, siendo su media de edad de $8,8 \pm 4,5$ años.

En la población española, la alergia al marisco, como a otros alimentos, no está condicionada por el sexo [143, 214, 215], al igual que ocurre en la población estudiada en este trabajo. Según la bibliografía, la alergia al marisco presenta una distribución similar entre hombres y mujeres, y las diferencias encontradas por algunos autores podrían estar condicionadas por factores como la edad o la existencia de atopia en diferentes proporciones de la muestra [216-220]. Sin embargo, respecto a otras fuentes alérgicas sí se han encontrado diferencias en función del sexo como ocurre en la alergia a la leche, siendo mayor en hombres que en mujeres (18% vs 10,1%, $P<0,05$) [15].

En este estudio, además de la población de Madrid, se ha incluido otra población procedente de Lugo con el objetivo de analizar diferentes perfiles de sensibilización de los pacientes de distintas zonas geográficas con diferentes climas: población de Madrid con clima continental seco y población de Lugo con clima costero húmedo. Asimismo, se ha visto que a la hora de caracterizar una nueva fuente alérgica e identificar sus alérgenos mayoritarios, éstos dependen mucho de la población estudiada [160, 162, 221, 222].

1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ALERGIA AL MARISCO

Entre los sujetos incluidos en este trabajo, el 40% (18/45) de los individuos de Madrid presentaban sintomatología frente al marisco y al ácaro, mientras que entre la población de Lugo, había un mayor porcentaje (69%, 20/29) de individuos que presentaban síntomas frente a estas dos fuentes alérgicas. Estos resultados pueden explicarse por una mayor carga ambiental de ácaros en las zonas húmedas de costa [223], lo cual hace que esta población muestre una fuerte asociación entre la hipersensibilidad a los ácaros y el riesgo de presentar una sensibilización al marisco.

Muchos individuos creen presentar alergia al marisco, pero se ha demostrado que la mayoría no son realmente alérgicos a dicho alimento, sino que han presentado reacciones de causa desconocida, aunque una posibilidad que se puede barajar es que hayan perdido la sensibilidad clínica [224].

La alergia a marisco se incluye dentro de las alergias a alimentos de tipo inmediato [225], cuyo cuadro clínico más frecuente es el de urticaria y angioedema por ingestión. Dentro de la sintomatología en la población de Madrid estudiada, la urticaria fue el síntoma que mayor número de individuos presentaron; sin embargo, sólo 3 sujetos de los 36 individuos con síntomas frente a marisco presentaron angioedema (**Figura 17**). En la población de Lugo, la urticaria y el angioedema fueron los síntomas más usuales, siendo el angioedema el más frecuente (**Figura 19**).

El síntoma más grave de la alergia a alimentos es la anafilaxia, y su frecuencia varía según el tipo de alimento. Se ha demostrado que este tipo de reacción se produce en respuesta a la sensibilización a alérgenos resistentes a enzimas gástricas, como ocurre en el caso del melocotón, donde el 26% de los afectados presentan síntomas sistémicos, relacionados con la sensibilización a la LTP [226]. En este trabajo se ha demostrado que las proteínas de la gamba *S. melantho* son digeridas por la enzima gástrica pepsina, y por lo tanto, esto explicaría la baja frecuencia de anafilaxia (3/36) (**Figura 16**) como manifestación clínica de la alergia al marisco en la población de estudio de Madrid.

Resultados similares obtuvieron Daul y cols. [227] en un estudio con PODCCP de pacientes con alergia a gambas, siendo los síntomas más frecuentes los de tipo cutáneo (90%), seguido por los síntomas respiratorios (42%), gastrointestinales (35%) y anafilácticos (10%).

Sin embargo, respecto a la frecuencia de anafilaxia frente al marisco, Wu y cols. [218] encuentran en una muestra de 84 pacientes alérgicos a marisco que el 33,3% presentaban anafilaxia. Los valores elevados referidos por Wu en cuanto a la frecuencia de anafilaxia, pueden deberse a una definición de anafilaxia diferente, ya que Wu sólo exige que la gravedad de los síntomas precisara atención de un servicio de urgencias. Los datos de Daul y cols. [227] hacen pensar que el concepto de anafilaxia sea similar al definido en este trabajo para la población de Madrid, en el que además de afectación de al menos dos órganos, deben presentar síntomas de afectación del sistema cardiovascular o exclusivamente afectación cardiovascular [227]. No obstante, en la población de Lugo, la anafilaxia fue el tercer síntoma más común entre los individuos con síntomas a marisco, por lo que para esta población podría haberse aplicado un concepto diferente de anafilaxia que el empleado en la población de Madrid.

En la población de Madrid, los órganos más frecuentemente implicados en las manifestaciones clínicas de los individuos fueron el sistema cutáneo y el respiratorio, dependiendo de si los síntomas eran frente al marisco (**Figura 16**) o frente al acaro (**Figura 17**), respectivamente.

Cabe destacar la alta frecuencia de síntomas cutáneos y la escasa de síntomas digestivos, siendo estas proporciones similares a las referidas por Daul y cols. [227]. Hay que tener en cuenta que, aunque la vía habitual de exposición al marisco es la digestiva, también puede ser por inhalación de vapores o por contacto (manos y zona peribucal) [147, 216]. De este modo, el individuo 12 que presenta exclusivamente asma, tanto frente a marisco como a la exposición a ácaros, podría haberse sensibilizado a través de la vía respiratoria. En este sentido Sicherer [145], tras realizar una encuesta, encuentra que el 10% de las reacciones adversas al marisco, fueron producidas mediante contacto y/o inhalación.

En las poblaciones estudiadas, con sintomatología sólo a marisco, las manifestaciones clínicas más comunes en la población de Madrid son las cutáneas y en segundo lugar las respiratorias e intestinales, mientras que para la población de Lugo lo son las cutáneas y la anafilaxia; pero curiosamente en ambas poblaciones ningún individuo del grupo M presentaba SAO. Dicho síntoma, entre los individuos con sintomatología tanto con ácaro y marisco, como con marisco sólo, no se presenta más que en 5 de los 36 individuos de Madrid (14%), siendo 3 niños y 2 adultos; y en 5 sujetos de Lugo (5/24) (21%). Este dato contrasta con el SAO originado por alimentos vegetales ya que éste se produce con más frecuencia y en pacientes de más edad, asociándose sobre todo a otros síntomas más graves [228].

Dentro de los individuos con sintomatología frente a ácaros de Madrid, la rinoconjuntivitis fue el síntoma que presentaban con mayor frecuencia, dato que concuerda con lo publicado [229, 230].

2. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

En la mayoría de los casos, el diagnóstico de la alergia alimentaria se establece basándose en una historia clínica junto con la presencia de IgE específica frente al alimento sospechoso de ocasionar dicha alergia.

La prueba cutánea y la presencia de IgE específica en el suero del paciente, son pruebas que demuestran que existe sensibilización frente a un determinado alérgeno. Aunque con estas aproximaciones diagnósticas, probablemente, el diagnóstico de la alergia alimentaria ha sido sobreestimado (sin un valor predictivo positivo incluso con historia clínica positiva) [63, 231].

En los últimos años, diversos autores han publicado estudios en los que se ha intentado definir la utilidad de la prueba cutánea y la determinación de IgE específica como predictores de reactividad clínica, determinada esta última por el resultado de la PODCCP, que se considera la prueba de referencia.

El método estándar de referencia para el diagnóstico de la alergia alimentaria es la PODCCP [232, 233], aunque es poco utilizado y en muchas ocasiones no se realiza correctamente. Según el estudio de Alergológica 2005, sólo se han realizado provocaciones orales en el 13% de los casos de sospecha de alergia alimentaria, y en el 72% de estos casos, la provocación oral no ha sido doble ciego [15].

A pesar de que la provocación oral es el único método diagnóstico concluyente para la alergia alimentaria, éste no se emplea como método de rutina en el diagnóstico debido a su complejidad y su elevado coste sanitario, además del riesgo que supone para los pacientes; por lo que el diagnóstico de la alergia a alimentos normalmente se lleva a cabo mediante las pruebas cutáneas SPTs, probablemente debido a que se trata de un método fácil, seguro y económico, mediante el cual se obtienen resultados en tan sólo 15 min.

Respecto a los resultados del SPT de la población de Madrid, la totalidad de los individuos que tuvieron provocación oral positiva, también tenían pruebas cutáneas positivas, indicando la existencia de una relación positiva entre ambas pruebas y por tanto confirmando la alergia a la gamba [194]. Sin embargo, la frecuencia de tener resultados positivos o negativos en el SPT según la sintomatología no variaba, siendo ligeramente inferior en los individuos con sintomatología sólo a marisco.

A la hora de la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados de las pruebas cutáneas hay que tener en cuenta la calidad de los extractos alergénicos. Lo que asegura la calidad de un extracto alergénico, entre otros criterios, es la correcta estandarización en la producción del mismo. En el pasado, se obtenían resultados dispares y confusos, ya que la única información que se tenía sobre los extractos era la relación peso/volumen de las proteínas alergénicas. Para evitar esto se han establecido una pautas, especificando la necesidad de que los extractos alergénicos estén caracterizados y que se realice la cuantificación del alérgeno principal [234]. Pero este criterio, a la hora de estandarizar los extractos, no es del todo el indicado, dado que muchos pacientes que no estén sensibilizados al alérgeno mayoritario empleado para la estandarización del extracto podrían ser mal diagnosticados [162, 235].

Otro aspecto a tener en cuenta cuando se realizan las pruebas cutáneas con la gamba, al igual que con otros alimentos, es que éstos normalmente se consumen

cocinados, con lo cual estas pruebas deberían realizarse con extractos tanto crudos como cocidos. Según Carnés y cols. [236], el diagnóstico de la alergia a la gamba debería realizarse con el extracto de la gamba cocida, debido a que este extracto presenta mayor capacidad de unir IgE. A este respecto, cuando se realizaron los SPTs para evaluar el efecto del extracto hipoalergénico obtenido de la gamba, el extracto del *prick* comercial empleado no produjo pápula en 2 de los 5 pacientes, mientras que en estos 2 mismos individuos, sí lo hacía el extracto de gamba cocida y el SPPT con la gamba cruda *S. melanthero*.

Sin embargo, en el paciente 5, el extracto del *prick* comercial generaba una pápula mayor que la pápula generada con el extracto de gamba cocida, con lo cual, para este individuo podrían ser más relevantes ciertos alérgenos termolábiles, como la AK; por lo tanto, si sólo se utilizase el extracto cocido para estas pruebas, se perdería información relevante. Estos resultados ponen de manifiesto la limitación de esta técnica para el diagnóstico de la alergia a gamba, siendo la prueba diagnóstica de referencia la PODCCP. También corrobora la importancia de usar diferentes extractos en estas pruebas o estandarizar los extractos usados para las mismas.

En la rutina del diagnóstico de la alergia alimentaria, normalmente, el resultado del SPTs se confirma mediante determinación de IgE específica del suero del paciente frente al alimento sospechoso o los alérgenos mayoritarios de este alimento. Recientemente, Yang y cols. [237] han demostrado en una población brasileña que la detección de IgE frente a la TM está asociada a síntomas clínicos, a pesar de que 2 pacientes con POP tenían IgE específica negativa frente a la TM. En la población estudiada en el presente trabajo ocurre algo similar en dos individuos POP (6 y 8), de modo que el individuo 6, a pesar de ser rPen a 1 negativo por InmunoCAP y nPen m 1 negativo por inmunodetección, tenía IgE frente a la gamba detectada mediante estas dos técnicas, lo que podría indicar que este individuo es alérgico a la gamba pero está sensibilizado a otros alérgenos distintos de la TM.

En la población de Madrid, el 100% de los individuos POP tienen IgE específica frente al extracto de la gamba, mientras que sólo un 61% la tienen en el grupo PON, corroborando la alta sensibilidad de esta prueba pero su baja especificidad (alrededor del 50%). Además, estos resultados demuestran la correlación positiva existente entre esta prueba diagnóstica y el resultado de la PODCCP (**Figura 22**). Cuando se comparan los valores de IgE frente al alérgeno mayoritario de la gamba, rPen a 1, se obtienen valores similares de sensibilidad, pero la especificidad es mayor (77% *vs* 50%, POP *vs* PON, respectivamente).

En algunas alergias alimentarias, como las de la leche de vaca, cacahuete, huevo y soja, gracias a los valores de IgE específica se ha podido determinar el valor predictivo positivo como punto de corte capaz de predecir los resultados de las provocaciones [194, 237]. En el presente trabajo, a pesar de que los valores de IgE específica frente a la gamba son mayores en el grupo POP que en el grupo PON, no se pudo determinar este valor, por lo que la PODCCP sigue siendo la prueba de referencia para diagnosticar la alergia a la gamba. Las características de la población que se va a estudiar son factores decisivos ya que los puntos de corte serán diferentes según la edad, grado de enfermedad, coexistencia con otras enfermedades, tiempo de evolución de la enfermedad, número de

provocaciones orales a las que se ha sometido y un largo etc., con lo cual los valores descritos como puntos de corte también tienen sus limitaciones.

Por lo tanto, el diagnóstico de la alergia a la gamba es todavía un reto para los clínicos. Actualmente se trabaja para mejorar la calidad de los extractos y alérgenos empleados en el diagnóstico, así como para optimizar el empleo de nuevas técnicas de diagnóstico como los microarrays con proteínas purificadas o con péptidos que conforman los epítomos de las proteínas alergénicas, lo que permitiría en un futuro realizar un diagnóstico más exhaustivo a partir de una muestra de sangre [238]. Mientras tanto, las pruebas de provocación oral son la mejor herramienta para el diagnóstico final de la alergia alimentaria, como se ha demostrado en este trabajo; aunque debido al elevado riesgo para algunos pacientes, por su complejidad y coste, es necesario realizar estudios que ayuden a evitar dicha prueba.

3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ALÉRGENOS DE LA GAMBA *Solenocera melanthero*

La caracterización de nuevas fuentes alergénicas es de suma importancia para realizar un buen diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas.

Numerosos alérgenos de la gamba han sido descritos en diferentes especies de gambas, cangrejos, langostas y otros crustáceos; pero el panel de proteínas alergénicas de los crustáceos aún sigue incompleto.

En este trabajo se ha estudiado la alergia a la gamba *S. melanthero*, altamente consumida en España, como modelo para la identificación de nuevos alérgenos de la gamba.

Para poder caracterizar una nueva fuente alergénica, primero es necesario conseguir el extracto proteico de dicha fuente. Dado que las gambas utilizadas en la preparación de la papilla de la PODCCP no habían sido cocidas previamente, se obtuvo el extracto proteico a partir de la gamba cruda para mantener las mismas condiciones en los ensayos posteriores.

El extracto de gamba cruda que se obtuvo tenía una elevada cantidad de proteínas, algo que era de esperar dado que el extracto se realizó a partir del abdomen de la gamba congelada.

El análisis inicial del extracto de gamba crudo mediante SDS-PAGE reveló la existencia de numerosas bandas, destacando unas diez de ellas por su intensidad (**Figura 24**). Cuando se observa el perfil de reconocimiento de los pacientes de Madrid frente al extracto de la gamba *S. melanthero*, 17 de las bandas proteicas eran capaces de ser detectadas por la IgE sérica de los sujetos estudiados.

De todos los sueros empleados en la inmunodetección, sólo uno no tenía IgE específica para ninguna proteína del extracto de esta gamba, perteneciendo este suero a un individuo del grupo PON (nº 36 de la **Figura 25**).

El análisis del alergograma de la población inicial de estudio (Madrid) frente a la gamba *S. melanthero*, reveló que las proteínas de PM alrededor de 17-24, 31-35, 41 y 43 kDa, eran detectadas por más del 50% de esta población, y por lo tanto podían

considerarse alérgenos principales según la concepción clásica del término [135].

Curiosamente, la banda de 37-39 kDa, correspondiente con la TM, no llegó al 50% de reconocimiento del total de esta población (49%), pero si se descartan los individuos del grupo con síntomas sólo con ácaros, entonces este porcentaje alcanzó el 55% de reconocimiento. Esto confirma la importancia de tener bien caracterizada una población para poder determinar cuáles son o no los alérgenos mayoritarios en una población dada y poder compararlos con otras poblaciones.

Cuando se comparan los porcentajes de reconocimiento de las bandas proteicas, se observa que existen diferentes perfiles alergénicos frente a la gamba en función del grupo de pacientes, encontrándose una correlación entre presentar síntomas a A+M y tener una provocación oral positiva; y en presentar síntomas a M y tener resultados negativos en la provocación oral.

Ciertas proteínas, como las bandas proteicas de 17-24 kDa, poseen un porcentaje de reconocimiento elevado en todos los grupos, incluso en el grupo de individuos con síntomas a ácaros y que toleran la gamba; por lo tanto, esta proteína podría estar implicada en la sensibilización a estas dos fuentes alergénicas y en su RC.

Entre todas las proteínas detectadas por los sueros de los individuos de Madrid se seleccionaron aquellas que presentaban un mayor porcentaje de reconocimiento para ser identificadas mediante MS.

En este estudio se han analizado las proteínas del musculo abdominal de la gamba, pero también sería interesante estudiar las proteínas presentes en el caparazón, en la cabeza y en los vapores de cocción de esta gamba, ya que las vías de sensibilización al marisco pueden ser, intestinal, por contacto o por inhalación. Existen estudios en industrias de cocederos de marisco donde se ha demostrado, mediante cuantificación por MS, que la AK es una proteína termolábil que se evapora fácilmente y por lo tanto capaz de causar asma ocupacional [162].

3.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS ALÉRGENOS DE LA GAMBA *Solenocera melanthero*

El diagnóstico preciso de los pacientes con hipersensibilidad y el diseño de una inmunoterapia segura y eficaz, dependen del conocimiento del patrón de los componentes alergénicos de una fuente biológica.

Durante la última década, la investigación de proteínas alergénicas ha aumentado drásticamente el número de alérgenos bien caracterizados. Esto ha sido posible gracias al desarrollo de nuevas tecnologías. Así, la metodología de la proteómica y de la biología molecular se han utilizado con éxito en el campo de la investigación en alergia, y gracias a ellas se han podido identificar, purificar y clonar numerosos alérgenos [239-241].

La identificación de los alérgenos de la gamba *S. melanthero* se realizó a partir de un gel unidimensional teñido con azul coomassie coloidal, según las indicaciones del servicio de proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, del cual se pudieron escindir las bandas proteicas de forma aislada. El servicio de proteómica donde se

realizó la identificación mediante MS no tuvo ningún inconveniente metodológico a la hora de realizar dicha identificación, ya que las proteínas estaban bien separadas y se dedujo que no constituían una mezcla de varias proteínas.

Para identificar los alérgenos de una mezcla alergénica compleja, las proteínas se escinden a partir de geles bidimensionales, pero al igual que ocurre con los geles unidimensionales, éstos no están exentos de limitaciones. Entre estos inconvenientes destacan la falta de detección de proteínas poco abundantes, la baja resolución de las proteínas muy ácidas o muy básicas, y que las proteínas muy grandes o hidrofóbicas no entran bien en el gel durante la primera dimensión. Pero en el caso de las proteínas del extracto de la gamba, éstas no parecen tener un carácter hidrofóbico, ya que la resolución de las bandas proteicas es buena y las bandas aparecen bien definidas.

La identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas puede utilizar dos aproximaciones, la identificación por huella peptídica y la secuenciación *de novo*, esta última utilizada cuando, tras realizar la primera aproximación, se obtienen péptidos que no coinciden con ninguna proteína conocida. Se debe recurrir a la secuenciación *de novo* cuando la proteína con la que se busca homología no ha sido secuenciada, hecho que suele ocurrir con frecuencia en el ámbito de estudio de nuevos alérgenos. Curiosamente, las dos bandas proteicas del extracto de la gamba *S. melanthero* identificadas mediante secuenciación *de novo* resultaron ser una proteína previamente identificada en otras especies de gamba, la SCBP.

A la hora de comparar los PMs de las proteínas del extracto de la gamba *S. melanthero* con sus homólogas, éstos difieren ligeramente. Los motivos de estas diferencias pueden estar relacionados con las modificaciones post-transduccionales que sufren las proteínas según el tipo de organismo, o bien deberse a que las diferentes isoformas de una misma proteína presentan variabilidad respecto a su PM. Esto explica porqué el alérgeno Phl p 5 posee cuatro isoformas de 32 kDa y cuatro de 38 kDa, las cuales difieren respecto a su pI [242].

El hecho de que aparezcan 2 ó 3 bandas proteicas de diferente PM correspondiendo a la misma proteína, como ocurre con la TM y la SCBP de *S. melanthero*, ha sido descrito en el caso de la identificación de Lep w 1 como alérgeno principal del gallo (pescado) [243], entre otros ejemplos. En este artículo, se describen dos bandas captadoras de IgE, una de 8 y otra de 10 kDa aproximadamente, que corresponden a la misma proteína.

Así, gracias a esta metodología se pudieron identificar los alérgenos de la gamba *S. melanthero* que eran reconocidos por más de la mitad de los sueros de la población de Madrid, así como la proteína de PM alrededor de 94-99 kDa, que aun no considerándose un alérgeno mayoritario, era detectada por un elevado porcentaje de los grupos A+M y A. Recientemente, Asero y cols. [244] refieren nuevos alérgenos de la gamba de elevado PM que podrían estar involucrados en la RC con el ácaro, de ahí también el interés de identificar la proteína de 94-99 kDa.

En este trabajo se han identificado nuevos alérgenos de la gamba, hasta la fecha no descritos en ninguna otra especie de marisco, siendo estas proteínas homólogas a las proteínas FBPA, α -actinina, β -actina y UB.

Este hallazgo permitirá poder crear un panel más completo de los alérgenos de la gamba, necesario para un correcto diagnóstico y tratamiento adecuado.

Hasta el 2010, entre las numerosas bandas proteicas del extracto de gamba que eran capaces de unir IgE, solamente se habían identificado en diferentes especies de marisco las proteínas TM, MLC, SCBP y AK, siendo las tres primeras, proteínas implicadas en la contracción muscular.

Recientemente, Bauermeister y cols. [179], han identificado nuevas proteínas como alérgenos de la gamba *C. crangon*, siendo éstos la troponina C, proteína también implicada en la contracción muscular y la TPI involucrada en la glicólisis. Además, en ese mismo año (2011), Piboonpocanun y cols. identificaron otro nuevo alérgeno en la gamba gigante de agua dulce, la hemocianina [189].

La α -actinina, es una proteína muscular que se localiza en la zona Z del sarcómero, la cual permite que las actinas adyacentes estén unidas manteniendo así la continuidad con el sarcómero siguiente. Hasta hoy la mayoría de las proteínas alergénicas identificadas en los crustáceos son proteínas musculares, lo cual hace pensar que el resto de proteínas musculares podrían ser potenciales candidatos a ser proteínas alergénicas.

La α -actina es la actina presente en el citoplasma de las células musculares, mientras que en el resto de células lo es la β -actina. La actina forma los microfilamentos de las células, que pueden estar asociados en redes de microfilamentos bajo las membranas celulares para la exclusión de orgánulos, o asociados en haces de microfilamentos, los cuales están en contacto con la miosina no muscular e intervienen en el desplazamiento de sustancias a nivel intracelular. Hasta la fecha, tanto la α -actina como la β -actina, no han sido descritas como alérgenos en ninguna fuente alergénica, según la información de las bases de datos consultadas [169, 245, 246].

La FBPA, identificada también como nuevo alérgeno en esta especie de gamba, es una enzima que puede recibir diferentes nombres: aldolasa, D-fructosa-1,6-bisfosfato, D-gliceraldehído-3-fosfato-liasa o fructosa-1,6-bisfosfato triosa-fosfato-liasa. Hay dos tipos de FBPA, las de clase I y clase II, siendo estas últimas principalmente de origen microbiano. Esta enzima cataliza la siguiente reacción dentro de la glucólisis:



La primera vez que se identificó esta proteína como alérgeno fue en 1992 por Ishiguro y cols. en el hongo *Candida albicans* [247]. Posteriormente ha sido caracterizada como alérgeno de los hongos *Cladosporium* y *Penicillium* [248]. También ha sido identificada como alérgeno mayoritario en el mosquito *Forcipomyia taiwana* (For t 2) [185]. En el nemátodo *A. simplex*, López y cols. [249] identificaron una proteína de la familia de las FBPA, la cual se encontró en el 34% de los clones escrutados, indicando que esta proteína podría ser un nuevo alérgeno de este nemátodo con tanta importancia alergénica. En la cucaracha *B. germanica* también se ha identificado una aldolasa como alérgeno [188]. Esta proteína también ha sido identificada como alérgeno en organismos vertebrados acuáticos marinos, como en el salmón, atún y bacalao; y de agua dulce

como la Tilapia [250, 251]. En el reino vegetal esta enzima sólo fue identificada como alérgeno de la mandioca [252], aunque posteriormente estos mismos autores determinan que esta proteína de la mandioca, involucrada en el síndrome alérgico látex-frutas, pertenece a la nueva familia de proteínas internamente desestructuradas [253].

Otro de los nuevos alérgenos identificados en esta especie de gamba fue la proteína de bajo PM homóloga a la UB. Esta proteína también se identificó como alérgeno del extracto del ácaro *D. pteronyssinus*. Además, dado que esta proteína está muy conservada a lo largo de la evolución, y que la homología de la secuencia proteica entre las UBs del humano y de la levadura es del 96%, es probable que esta proteína también esté implicada en la RC entre los ácaros y la gamba, aunque este aspecto se discutirá en el siguiente apartado de este capítulo (4.2).

La UB está implicada en el reciclaje y/o eliminación de las proteínas. El proceso de ubiquitinización es un proceso dependiente de ATP y tiene diferentes fases en las cuales están involucradas las enzimas ligasas de UB (E1, E2 y E3) y la UB.

En las bases de datos de alérgenos consultadas [169, 245, 246], esta proteína no consta como alérgeno.

Visto que muchos de los alérgenos identificados en una fuente alergénica por primera vez, posteriormente los mismos autores que los identificaron se retractan, como ocurre con la FBPA [185, 254], en este trabajo se demostró mediante ensayos de inmunodetección que las proteínas identificadas se encuentran presentes en la gamba *S. melantho* (Figuras 27 y 28), y por lo tanto su identificación es inequívoca. En la Figura 28, al utilizar el suero de conejo pre-inm, se observa que el suero de este conejo también era capaz de detectar la FBPA, aunque con menor intensidad que el suero del conejo inmunizado con el extracto de la gamba *S. melantho*. Esta inmunorreactividad se debe a que la proteína FBPA empleada procede de musculo de conejo, con lo cual los anticuerpos IgG del suero empleado reaccionan con la FBPA purificada empleada.

Además de confirmar la identificación de estas proteínas como proteínas del extracto de *S. melantho*, también se demostró mediante los ensayos de inmunodetección de las proteínas purificadas con un *pool* de sueros de pacientes alérgicos a la gamba que, la FBPA, α -actinina, β -actina son nuevos alérgenos de esta especie de gamba (Figuras 29 y 30). La UB utilizada de origen bovino no fue detectada mediante estos ensayos, lo cual nos hace especular que con las UBs de origen vertebrado podría ocurrir lo mismo que con las TMs, que solamente son alergénicas las de los invertebrados, lo cual explicaría porque la IgE del *pool* de sueros empleada para estas inmunodetecciones no fue capaz de detectar la UB bovina.

La UB, además de identificarse en la gamba *S. melantho*, también se identificó en el ácaro *D. pteronyssinus*, lo cual demuestra que esta proteína es relevante, alergénicamente hablando, en los invertebrados.

Todos estos datos, nos hacen suponer que la identificación de esta proteína como alérgeno de la gamba es inequívoca.

Los otros alérgenos identificados en la especie de gamba *S. melanthero*, (TM, SCBP y AK) han sido previamente identificados en otras especies de marisco y/o invertebrados.

La TM, el alérgeno mayoritario de las gambas, ha sido identificado en numerosas especies de gambas y otros crustáceos, al igual que en gasterópodos, terrestres y acuáticos, cefalópodos, cucarachas, ácaros y nemátodos [134-139, 156-158].

Curiosamente, la TM sólo había sido identificada como alérgeno en organismos invertebrados, pero no en vertebrados, presentando una homología de secuencia entre el 80-99% y del 51 al 58% entre las TMs alergénicas y las no alergénicas, respectivamente [255]. Van Reese y cols., basándose en las características de la TM no alergénica del pollo, desarrollaron un hipoalérgeno mutante de la TM [257].

Recientemente, Liu y cols. [251] han identificado en el pescado de agua dulce *Oreochromis mossambicus*, además de la FBPA, una proteína homóloga a la TM. Ésta es la primera publicación que existe en la cual se identifica una TM de vertebrados acuáticos como alérgeno.

Otro alérgeno implicado en la alergia al marisco es la AK, proteína identificada como alérgeno en numerosas especies de gambas [160], cangrejos [162], cefalópodos [167], arañas [164], ácaros [246], nemátodos [165], cucarachas [163] y mosquitos [166]. Esta enzima es importante en el metabolismo energético de los invertebrados, ya que el exceso de energía puede ser almacenado como arginina-fosfato, mientras que los vertebrados usan la creatina fosfato como almacenamiento de energía, y por lo tanto poseen creatin kinasas, lo cual puede explicar porqué no se ha descrito esta proteína como alérgeno de vertebrados.

Sobre este alérgeno, a pesar de haberse identificado en todos estos organismos invertebrados y de que la homología de secuencia de las AK entre artrópodos pueden alcanzar el 82% [256], existen pocos estudios en los que se demuestre su implicación en la RC. Bi y Chew [257] demuestran que un elevado porcentaje de pacientes sensibilizados a la gamba son capaces de detectar la AK del ácaro *Dermatophagoides farinae*.

La primera vez que esta proteína se describió como alérgeno fue en la polilla *P. interpunctella* [161]. En la gamba, concretamente en la especie *P. monodon*, se describió la AK como alérgeno en el 2003 [160], identificándose posteriormente sus epítomos alergénicos [154].

Según la población estudiada, este alérgeno se ha considerado como un alérgeno minoritario del marisco [160], pero otros autores han visto que la AK puede ser considerado un alérgeno mayoritario [162] como ocurre en la población estudiada de Madrid del presente trabajo; sin embargo, según el alergograma frente a la gamba, para la población de Lugo este alérgeno no parece ser relevante (Figura 34).

Otro de los alérgenos identificados en la gamba *S. melanthero* es la SCBP. Esta proteína ha sido identificada como alérgeno minoritario en otras especies de gamba, por lo tanto su identificación en la especie *S. melanthero*, aunque se realizó con un único péptido, se consideró correcta. En el 2008, Shiomi y cols. identificaron esta proteína como alérgeno exclusivo de gambas y cangrejos de río [171], y posteriormente Chen y

cols. purificaron y caracterizaron esta proteína como alérgeno del cangrejo *P. clarkii* [173]. Ayuso y cols. [172], identifican y clonan la SCBP de la especie *L. vannamei* (Lit v 4), siendo la frecuencia de reconocimiento del 59,6%, e incluso señalaron que para algunos individuos esta proteína era más importante que la TM. En la población de este estudio se observa que esta proteína también presentaba una elevada frecuencia de reconocimiento, siendo esta igual, o incluso superior a la de la TM, según el grupo estudiado (figuras alergogramas). Por lo tanto, dependiendo de la población estudiada, la SCBP podría ser considerada un alérgeno mayoritario.

Esta proteína pertenece a la familia de las proteínas de unión a calcio, al igual que el alérgeno mayoritario del pescado parvalbumina [243]; las cuales están implicadas en el proceso de relajación y contracción de las fibras musculares [175, 258]. Se caracterizan por la presencia de una estructura muy conservada de doble hélice unida por un *loop* o bucle. Esta estructura permite al motivo *EF-hand* la unión covalente de dos cationes divalentes, Ca^{2+} o Mg^{2+} . Las estructuras proteicas de unión a calcio están muy bien conservadas en todo el reino animal, pero su homología disminuye a medida que las especies se alejan filogenéticamente [259].

Aunque en la especie *S. melanthero* no se han identificado otros alérgenos descritos previamente en otras especies de gamba, como la troponina C, la TPI, la hemocianina y la MLC [168, 179, 189], esto no implica que no sean también alérgenos de esta gamba, dado que en el extracto de la gamba *S. melanthero* aun se observan bandas capaces de unir IgE sin identificar.

4. ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD CRUZADA

4.1 ESTUDIO COMPARATIVO DEL ALERGOGRAMA DE DOS POBLACIONES DIFERENTES FRENTE A LOS EXTRACTOS DE GAMBA Y ÁCARO

La RC entre la gamba y el ácaro se ha estudiado y se sigue estudiando, dado que hasta hoy solamente se ha identificado como responsable de esta RC al alérgeno mayoritario de la gamba, la TM, la cual es un panalérgeno identificado en numerosas especies de artrópodos y nemátodos [134, 135, 137, 139, 155-159].

A pesar de haberse identificado nuevos alérgenos en la gamba, no hay trabajos que identifiquen y demuestren la RC entre estas dos fuentes alergénicas causada por otros alérgenos diferentes a la TM.

Ciertos autores, como Asero y cols. [244], han indicado que en la población adulta italiana estudiada, además de la TM, existen otras proteínas de alto PM que podrían estar involucradas en la RC entre la gamba y el ácaro. Estos autores, mediante ensayos de inhibición, demuestran que una proteína de >67 kDa está implicada en esta RC, pero no han identificado la proteína en cuestión. De acuerdo con el PM, esta proteína podría tratarse del alérgeno recientemente identificado como hemocianina, aunque Piboonpocanun y cols. [189] dicen que este alérgeno no está involucrado en la RC entre el ácaro y la gamba.

La sensibilización de una población a una fuente alérgica determinada, está condicionada por varios motivos, destacando entre ellos la zona geográfica que determina el clima de dicha zona. Se ha demostrado que en las zonas de costa y clima húmedo, la sensibilización a ácaros es mayor debido a la elevada carga ambiental de sus alérgenos [260, 261]; sin embargo, sobre la abundancia de alérgenos de ácaros en las zonas de interior con clima continental, no se tiene mucha información. Platts-Mills y cols. [262] sugirieron que los ácaros no deben de ser muy abundantes en estas áreas, por lo tanto sus alérgenos no se consideran relevantes en este ambiente. Sastre y cols. [223] demostraron que los niveles de alérgenos de ácaros detectados en las casas de pacientes asmáticos de Madrid eran generalmente bajos.

Por esta razón, en este trabajo se han estudiado dos poblaciones diferentes, una con clima seco y continental (Madrid) y otro húmedo y costero (Lugo), para determinar si los perfiles alérgicos frente a la gamba y al ácaro presentaban diferencias en función de una mayor o menor carga ambiental y sensibilización a los ácaros. Los alergogramas, tanto de la gamba, como del ácaro, de ambas poblaciones difieren entre sí. Los pacientes de Lugo, al estar expuestos a una mayor carga alérgica de ácaros se esperaba que estuviesen sensibilizados frente a numerosas proteínas de dicha fuente alérgica, pero sorprendentemente, la mayoría de los individuos de esta población sólo eran capaces de detectar la proteína de bajo PM identificada como UB (**Figuras 36 y 37**). Riedl y cols. [263] demuestran, utilizando la hemocianina como modelo de neoantígeno, que la elevada exposición a un antígeno puede evitar la sensibilización al mismo. Sin embargo, la mayoría de los autores han demostrado desde hace tiempo que a mayor exposición a un antígeno, mayor probabilidad de estar sensibilizado [264].

La abundancia de los ácaros, junto con otros parásitos o gusanos, en zonas húmedas tropicales podría favorecer que la población estuviese protegida frente a nuevas sensibilizaciones, debido a la teoría de la hipótesis de la higiene [265]. No obstante, otros autores [158] han demostrado que esta abundancia de ácaros y parásitos podría favorecer el desarrollo de nuevas sensibilizaciones debido a las RC, como por ejemplo se ha demostrado entre el acaro y *Ascaris* u otros nemátodos.

Por otro lado, en las zonas costeras de clima frío, donde la carga ambiental de ácaros no es muy elevada, la sensibilización a ácaros no debería ser relevante; sin embargo, en un trabajo publicado sobre una población de Islandia [159], se han encontrado sujetos que presentan síntomas frente a ácaros debido a la sensibilización a gamba.

En la población de Lugo (clima húmedo templado), los individuos están expuestos a una elevada carga de ácaros y reaccionan con las proteínas de la gamba responsables de la RC, como es el caso de la UB.

Los alergogramas de las dos poblaciones frente al extracto de la gamba, demuestran que en función de la población estudiada, unas proteínas son más relevantes que otras. Así, para el grupo A+M de la población de Madrid, entre las proteínas identificadas en la gamba, se consideran alérgenos mayoritarios la FBPA, AK, TM, SCBP y UB, mientras que para este mismo grupo pero de la población de Lugo sólo lo son la proteína AK y UB (**Tabla IX**).

La AK y la SCBP son alérgenos mayoritarios comunes en el grupo M de ambas poblaciones, mientras que son exclusivos para este grupo la FBPA en la población de Madrid, y la TM y UB en la población de Lugo. Todos estos resultados confirman la importancia de la población estudiada a la hora de caracterizar una fuente alérgica e identificar sus alérgenos mayoritarios.

La cultura y las costumbres de la población estudiada también tienen un papel importante a la hora de caracterizar los alérgenos de una fuente alérgica. Un claro ejemplo lo encontramos en los países asiáticos, tales como Japón, China y Taiwán, donde el consumo de productos marinos es muy elevado, y la forma de consumirlos difiere de la forma europea. Además, actualmente nuevas costumbres culinarias se están haciendo hueco en las ciudades europeas, entre ellas el consumo de productos marinos crudos, lo cual también podría explicar que esta proteína termolábil aparezca como un alérgeno mayoritario en las dos poblaciones estudiadas.

El consumo de los productos crudos hace que los alérgenos termolábil, como la AK, tengan mayor prevalencia en las poblaciones asiáticas que en las poblaciones europeas. De este modo, Sahabufin y cols. [136] consideran como alérgenos mayoritarios de su población las proteínas de 42 y 75 kDa, aunque no las identifican, sus PMs corresponden con las proteínas ya identificadas como alérgenos de la gamba, AK y hemocianina. Yadzir y cols. [222], describen una proteína de 42 kDa termolábil como alérgeno mayoritario en extracto crudo de gamba, al igual que Yu y cols. lo hacen en el cangrejo *Scylla paramamosain* [266]. Sin embargo, en la revisión reciente sobre alergia al marisco de Leung y cols. [267], se sigue afirmado que la TM es el alérgeno mayoritario del marisco.

En la población de Lugo con síntomas sólo a marisco, la AK alcanza un 50% de frecuencia de reconocimiento, considerándose para esta población un alérgeno mayoritario, igual que lo es la TM. Esto podría explicarse porque en Galicia los cocederos de marisco son abundantes y en los aerosoles de la cocción del marisco se han detectado niveles elevados de AK, considerándose esta proteína como una de las responsables del asma ocupacional en la industria marisquera.

El estudio del perfil alérgico que presentan estas dos poblaciones frente al extracto del ácaro difiere entre Madrid y Lugo.

En la población total de Madrid, ninguna proteína del extracto del ácaro alcanzó el 50% de reconocimiento, mientras que en Lugo, este porcentaje lo alcanzó la proteína de bajo PM identificada como UB. La proteína de alto PM detectada en el inmunoblot del extracto de ácaro *D. pteronyssinus*, y de PM equivalente a la proteína identificada como α -actinina en la gamba *S. melanthero*, fue detectada por más del 50 % de los individuos del grupo A+M y A de la población de Madrid, considerándose pues un alérgeno mayoritario del ácaro para estos grupos y en esta población. Aunque no se ha identificado esta proteína como alérgeno en el ácaro, ni en ninguna otra fuente alérgica, la α -actinina, al ser detectada por ambos grupos de pacientes, A+M y A, podría estar implicada en la RC ácaro-marisco, y esto se demostró mediante los ensayos de inhibición de la inmunodetección (**Figuras 41-43**). En el caso de la población de Lugo, el alérgeno del extracto del ácaro *D. pteronyssinus* más relevante, si no el exclusivo de esta población, es la proteína de bajo PM identificada como UB.

Las frecuencias de reconocimiento de la TM en ambos extractos difieren según los grupos, siendo significativamente mayor en el extracto de la gamba para los individuos A+M de Madrid.

En el grupo M de la población de Madrid, los porcentajes de reconocimiento de la TM, tanto en gamba (33%) como en ácaro (40%), son muy parecidos, indicando que a pesar de que la cantidad de TM en el ácaro es muy inferior a la presente en la gamba, este grupo de pacientes sensibilizados sólo a marisco, poseen anticuerpos IgE capaces de unirse a una ínfima cantidad de TM presente en el ácaro [191].

La frecuencia de reconocimiento de la TM de la gamba por parte del grupo A de Madrid tan sólo es de un 22%, dato que está en concordancia con el hecho de que en los individuos con síntomas a ácaros de Europa y EUA, este alérgeno no esté involucrado en el proceso de sensibilización de los pacientes alérgicos a los ácaros [268-272]. A pesar de los bajos niveles de TM detectados en los ácaros en comparación con los niveles detectados en crustáceos, un estudio en África demostró que la frecuencia de reconocimiento de rDer p 10 puede ser significativa (55%), lo cual refleja la sensibilización a este panalérgeno presente en parásitos [273]. Además, en un estudio de 1322 pacientes, han demostrado que Der p 10, la TM del ácaro *D. pteronyssinus*, puede ser un alérgeno importante para alguno de los pacientes sensibilizados a ácaros [235].

4.2. PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE LA GAMBA Y EL ÁCARO

La RC se define como el reconocimiento de distintos antígenos por un mismo anticuerpo IgE, demostrable mediante pruebas *in vivo* e *in vitro*, ocasionando manifestaciones clínicas asociadas a antígenos homólogos de diferentes especies, normalmente relacionadas, aunque también pueden no estar emparentadas filogenéticamente.

La gamba y el ácaro, aunque pertenecen a diferentes subfilos dentro de los artrópodos, están filogenéticamente relacionados; por tanto, es probable que muchas de sus proteínas guarden cierta similitud, con lo cual podrían estar involucradas en la RC entre estas dos fuentes alérgicas, explicando esto el elevado número de individuos de la población estudiada, tanto la de Madrid como la de Lugo, que presentan manifestaciones clínicas frente a ambas fuentes alérgicas (50% y 83%, respectivamente). Esto se corrobora y confirma ya que cuando se comparan los niveles de IgE específica frente a ambos extractos, se observa que la totalidad de los individuos que presentan sintomatología frente a las dos fuentes alérgicas, tienen IgE positiva frente al ácaro y el 89% lo hace frente a la gamba (**Figura 22**). Según los datos obtenidos y discutidos en el apartado anterior, además de la TM, existen otras proteínas que también podrían estar implicadas en la RC entre el ácaro y la gamba, como la UB y la α -actinina.

Se comprobó mediante ensayos de inhibición de la inmunodetección que la TM del extracto de la gamba *S. melantho*, y las TMs purificadas nPen m 1 y rDer p 10, tienen un alto grado de inhibición entre ellas, lo que demuestra una elevada RC (**Figura 40**). En estos ensayos, cuando se utilizó como inhibidor la proteína rDer p 10, a pesar de que las TMs de gambas y ácaros presentan una homología de secuencia aproximadamente del

80% [274], no se alcanzó una inhibición completa debido a que estas proteínas poseen epítomos IgE específicos según la especie. Ayuso y cols. [275] demuestran que la TM Pen a 1 presenta unos epítomos IgE específicos (5b y 5c) que no poseen las TMs del ácaro, Der p 10 y Der f 10, ni la de la cucaracha, Per a 7.

También se debe tener en cuenta que la TM no es muy abundante en los ácaros [274], y por lo tanto no tiene relevancia en el proceso de sensibilización en Europa y EUA [268-270]. Además, los sueros del *pool* empleado en estos ensayos proceden de sujetos de la población de Madrid, en la cual se ha demostrado que la carga ambiental de ácaros no es elevada [223].

Cuando se compararon las frecuencias de reconocimiento de los nuevos alérgenos identificados en la gamba, aquellas proteínas en las cuales no se encontraron diferencias significativas entre la gamba y el ácaro, podrían ser consideradas como nuevos alérgenos responsables de la RC entre estas dos fuentes alergénicas. Así, encontramos que la α -actinina y la UB tienen similares porcentajes de reconocimiento en ambos extractos, por lo tanto podrían estar implicadas en la RC (**Tabla IX**). Esto se demostró mediante los ensayos de inhibición de la inmunodetección con diferentes *pools* de sueros de ambas poblaciones (**Figuras 41-43**).

Además de estos nuevos alérgenos identificados en la gamba como responsables de la RC, según los alergogramas frente a ambos extractos, cuando se comparan las frecuencias de reconocimiento de la proteína SCBP, se observa que esta proteína es relevante en ambos extractos para los individuos del grupo M de Madrid (89% en gamba y 67% en ácaro), siendo igualmente detectadas (67%) por los individuos A y M en el extracto de la gamba y el ácaro, respectivamente. En Lugo ocurre lo mismo, los porcentajes de reconocimiento de la SCBP en el ácaro y en la gamba por parte de los grupos M y A, respectivamente, son muy similares. Recientemente, Villalta y cols. [276] han demostrado mediante ELISA de inhibición que una proteína de la gamba de 20 kDa también podría estar implicada en la RC con los ácaros, pero no han identificado dicha proteína.

En la población de Lugo, la proteína AK parece ser un alérgeno importante del extracto de la gamba para los grupos A+M (50% reconocimiento) y M (75%), pero más relevante es el hecho de que en el extracto del ácaro, esta proteína sea igualmente detectada por el grupo M (25%) como por el grupo A (20%).

Cuando se realizaron los ensayos de inhibición con el *pool* de sueros de Lugo que detectaban pocas bandas en el extracto de la gamba, la capacidad de la AK de unir IgE se inhibía completamente cuando este *pool* de sueros se pre-incubó con el extracto de ácaro, alcanzándose una inhibición parcial cuando se empleó la gamba como extracto inhibidor (**Figura 42**), demostrándose así su implicación en la RC entre ambas fuentes alergénicas en la población de Lugo.

A la hora de estudiar la RC hay que tener en cuenta el factor del sensibilizante primario, es decir, que fuente alergénica es la responsable de sensibilizar al individuo causándole la alergia y consecuentemente la RC. Según la población estudiada y mediante los ensayos de inhibición de la inmunodetección cruzada, se demostró que en la población de Madrid, el sensibilizante primario era la gamba, a través de las proteínas TM, UB y α -actinina. Mientras que en la población de Lugo, el sensibilizante primario

fue el ácaro, siendo las proteínas responsables de la RC la TM, la AK y UB. Boquete y cols. [277] sugieren que, en su población de estudio, el sensibilizante primario es el ácaro y que la RC entre ambas fuentes alergénicas es debida a otras proteínas distintas de la TM. Nuestros resultados de los ensayos de inhibición de la inmunodetección con un *pool* de sueros procedentes de una población similar, corroboran los resultados obtenidos por Boquete y cols., demostrando además que las proteínas AK y UB son las responsables de la RC entre ambas fuentes alergénicas, siendo el ácaro el responsable de la sensibilización primaria.

5. APROXIMACIONES PARA LA OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO DE GAMBA HIPOALERGÉNICO

Como se ha mencionado anteriormente, en la actualidad, el único tratamiento eficaz para la alergia a la gamba es no consumirla. Evitar el alimento es el mejor tratamiento, pero no siempre es posible debido a las trazas de ciertos alimentos enmascarados en muchos productos.

Por ello, es de vital importancia desarrollar un tratamiento eficaz para poder evitar los síntomas de la alergia al marisco y a cualquier alimento alergénico.

En este trabajo se ha intentado desarrollar un extracto de gamba hipoalergénico con el objetivo de obtener un tratamiento eficaz para este tipo de alergia alimentaria. Para ello se realizaron diversas aproximaciones, las cuales se detallarán y discutirán a continuación.

5.1 TRATAMIENTO DEL EXTRACTO DE GAMBA MEDIANTE CALOR

Se ha visto que según la fuente alergénica estudiada, las proteínas pueden ser modificadas tras el procesamiento térmico aumentando o disminuyendo su capacidad de unir IgE. Así, por ejemplo, en el caso de la leche [278], proponen que el tratamiento de la leche con calor podría utilizarse para desarrollar leche hipoalergénica en el futuro, considerando siempre el riesgo de la aparición de nuevos epítomos durante el proceso de producción.

Durante la cocción de los alimentos, se alcanzan altas temperaturas que pueden romper los puentes disulfuro de las proteínas, modificar su estructura secundaria o terciaria, y esto a su vez, modificar la capacidad de unir

IgE, bien eliminando los epítomos de unión de IgE, o bien exponiendo otros epítomos y haciéndolos más accesibles [279].

Por todo ello, se decidió comprobar qué ocurría exactamente con las proteínas del extracto de la gamba al ser sometidas a calor.

Para ello se obtuvieron diferentes extractos de la gamba *S. melanthero*: crudo, cocido y del líquido de cocción, observándose que no había diferencias significativas ni en el perfil proteico, ni en la capacidad de unir IgE de las proteínas de estos extractos (Figuras 44 y 45). A pesar de que la cocción no altera el perfil proteico, parece que sí

aumenta la capacidad de unir IgE de las proteínas, sobre todo las de alto PM (**Figura 45**). En concordancia con estos hallazgos, otros autores [236] han demostrado un aumento de la capacidad de unir IgE del extracto de gamba cocida en comparación con el extracto de gamba cruda.

Por el contrario, Huang y cols. [280] demuestran que la cocción del extracto de la gamba disminuye la capacidad de unir IgE, aunque la TM purificada presenta mayor capacidad de unir IgE que cruda. Esto puede estar influenciado por el efecto protector de la matriz de las otras proteínas del extracto [281].

Recientemente, Yadzir y cols. [222] demuestran como la TM purificada de esta gamba, al tratarse con calor se desnaturaliza, pero puede volver a su forma nativa al enfriarse, recuperando su conformación y su capacidad antigénica tras ser sometida a altas temperaturas.

En un extracto completo hay que tener en cuenta que ciertas proteínas podrían ser termolábiles y otras termorresistentes. Así, en el extracto de la gamba, además de la TM termorresistente, hay otras proteínas, como la AK, que son termolábiles, además de fácilmente aerosolizadas, con lo cual pueden no encontrarse presentes en el extracto de gamba cocida [148]. Esto mismo ocurre con los alérgenos del extracto del cacahuete, siendo Ara h 1 termorresistente y Ara h 2 termolábil [282]. Además, los diferentes métodos empleados como tratamiento térmico (cocer, freír, tostar...), también pueden influir en la capacidad de los alérgenos de unir IgE; así Blanc y cols. han encontrado diferencias respecto a los alérgenos del cacahuete cuando estos han sido tostados o cocidos [283]. Estos autores demuestran que el alérgeno Ara h 1 cuando se cuece forma agregados morfológicamente diferentes que cuando se tuesta, los cuales presentan menor capacidad de unir IgE. Aunque a la hora de demostrar si un alérgeno sigue o no manteniendo su capacidad alergénica, además de su capacidad de unir IgE hay que confirmarlo mediante ensayos funcionales como hicieron Vissers y cols. [282] con el cacahuete tostado.

5.2. TRATAMIENTO DEL EXTRACTO DE GAMBA MEDIANTE DIGESTIÓN GÁSTRICA

Numerosos trabajos describen que una de las características que hace que los alimentos posean proteínas alergénicas, es su resistencia a ser digeridas tras su paso por el tracto digestivo [284], como las nsLTPs que son resistentes tanto a la digestión gástrica como a la digestión intestinal [115, 117, 285].

En este trabajo se demuestra que las proteínas del extracto de la gamba, tanto cruda como cocida, pueden ser digeridas por la enzima gástrica pepsina, y que además éstas disminuyen considerablemente su capacidad de unir IgE (**Figuras 46 y 47**). Estos resultados sin embargo difieren de los obtenidos por otros autores [286], probablemente debido a las diferentes condiciones experimentales empleadas, como por ejemplo, el ratio de pepsina/proteína usado.

La elección del ratio pepsina/substrato adecuado para los ensayos de digestión *in vitro* resulta complicado ya que las propiedades fisiológicas de la digestión varían de una persona a otra. Además, hay que tener en cuenta que la actividad de la pepsina puede variar según el pH de la digestión, pudiendo ser incluso inactivada [287].

Otro aspecto a tener en cuenta es si las proteínas que se van a someter a la digestión *in vitro* están aisladas o poseen una matriz protectora, ya que esto puede modificar la digestibilidad de dichas proteínas [281, 284, 288].

Por todo ello, en los ensayos de digestión *in vitro* de este estudio se utilizó el fluido gástrico estándar (según farmacopea americana) y distintos ratios de pepsina/proteína, con el fin de comparar la digestibilidad de las proteínas de los extractos de gamba, observando que al aumentar la cantidad de pepsina, las proteínas de ambos extractos, crudo y cocido, eran rápidamente degradadas en fragmentos de pequeño PM, aunque su capacidad de unir IgE no desaparecía completamente hasta los 60 min de la digestión (**Figura 47**).

En la literatura se describe que en los ensayos de digestión con pepsina en los cuales se quiere demostrar si una proteína es alergénica o no en función de su capacidad de resistir a la digestión gástrica y por tanto perder o retener su capacidad para sensibilizar a través del tracto digestivo, se han utilizado principalmente proteínas purificadas, pero esta aproximación no es del todo acertada, dado que en la digestión *in vivo* las proteínas y los carbohidratos presentes en un alimento, proporcionan una matriz protectora a las proteínas alergénicas que les hace resistentes a ser degradadas por las enzimas gástricas [281].

Con el objetivo de demostrar si este efecto protector de la matriz de proteínas del extracto completo sobre la digestibilidad de la TM aislada ocurría en la gamba, se purificó la TM de la gamba *S. melantho* siguiendo el protocolo realizado por Kunimoto y cols. [202] y seguido por otros autores [280, 286].

Cuando se realizaron las aproximaciones experimentales de la digestibilidad de la TM purificada, se observó que ésta es más fácilmente digerida por la pepsina que la TM en el extracto completo de la gamba (**Figuras 48 y 46**, respectivamente), corroborando pues el efecto protector que ejercen los componentes del extracto o de otros alimentos [281].

Como se ha comentado anteriormente, otro de los factores que influyen en la digestión es el pH gástrico, el cual puede variar en ciertas condiciones fisiológicas, por ejemplo cuando los individuos consumen protectores estomacales [289, 290], o como ocurre en los niños, los cuales tienen un pH estomacal más elevado que los adultos [291]. Por eso se realizaron los experimentos de susceptibilidad a la digestión con pepsina modificando ligeramente el pH de 1,2 a 3,0, como podría ocurrir en ciertas circunstancias como, por ejemplo, tras el consumo de protectores estomacales [292].

Estos experimentos demuestran que la pepsina es capaz de degradar las proteínas del extracto de la gamba a pH 1,2, mientras que si este pH aumenta sutilmente, su capacidad enzimática se ve ligeramente modificada, haciendo que algunas proteínas no sean degradadas completamente. Estas diferencias se ven reflejadas en los perfiles proteicos, así como en la capacidad de unir IgE del extracto de gamba digerido a diferente pH (**Figura 52**). Esto podría explicar en parte el aumento de la alergia alimentaria en personas mayores, la cual podría achacarse en parte al elevado consumo de protectores estomacales entre esta población [289, 290].

6. ESTUDIO DEL EXTRACTO COCIDO Y DIGERIDO DE GAMBA COMO EXTRACTO HIPOALERGÉNICO

Actualmente, el tratamiento de la alergia alimentaria, debido a que los alimentos alergénicos tienden a inducir numerosas reacciones adversas, no se realiza mediante inmunoterapia común [72]. No obstante, se están desarrollando nuevas estrategias prometedoras para el tratamiento de la alergia, las cuales proponen modificaciones en los alérgenos o extractos alergénicos con el fin de que éstos no conserven su capacidad de unir anticuerpos IgE, sean capaces de inducir anticuerpos IgG específicos, y preserven la reactividad de las células T [293].

6.1. DISMINUCIÓN DE LA ALERGENICIDAD DEL EXTRACTO DE GAMBA HIPOALERGÉNICO

Gracias a las aproximaciones desarrolladas en este estudio, mediante el tratamiento con pepsina se ha conseguido obtener un extracto de gamba con la capacidad de fijar IgE reducida. Esto se ha demostrado mediante diferentes aproximaciones experimentales: inmunodetección y ELISA de inhibición (**Figuras 47 y 54**). No obstante estos ensayos *in vitro* no son suficientes para demostrar la disminución de su alergenidad, siendo necesarias diferentes pruebas funcionales que demuestren su menor capacidad alergénica [280, 286].

En el presente estudio, se muestra por primera vez como el extracto de la gamba *S. melanthero* cocido digerido con 10 U de pepsina/ μ g durante 60 min (SMCoD₆₀) presenta menor alergenidad que el extracto de gamba *S. melanthero* cocido sin digerir (SMCo), a través de pruebas *ex vivo* (TABs) e *in vivo* (SPTs).

La disminución de la activación de basófilos del SMCoD₆₀ en comparación con el SMCo (**Figuras 57 y 58**), indica que el extracto SMCoD₆₀ posee una alergenidad reducida en comparación con el SMCo. Vassilopoulou y cols. [294] obtuvieron resultados similares con la proteína LTP digerida de la uva, la cual presentaba menor capacidad de unir IgE además de menor capacidad de liberación de histamina. Igualmente, Campana y cols. [295] demostraron la disminución de la alergenidad de los derivados hipoalergénicos de Bet v 1 en 4 de los 6 pacientes mediante la cuantificación de la sobreexpresión de CD203c de los basófilos activados.

La alergenidad reducida del extracto SMCoD₆₀, probada por la disminución de la activación de basófilos, se confirmó mediante pruebas cutáneas SPTs en pacientes alérgicos a la gamba (**Tabla X**). Los diámetros medios de las pápulas obtenidas con los extractos digeridos durante 10 s ó 60 min, fue 1,5 ó 3 veces inferior que el diámetro medio de las pápulas obtenidas con el extracto SMCo sin tratar (**Figura 56**). Estos resultados confirman que el extracto SMCoD tratado 60 min es capaz de disminuir significativamente la liberación de histamina en los pacientes alérgicos a la gamba.

Por lo tanto, se demuestra que el extracto SMCoD₆₀ posee menor capacidad de fijar IgE y que, además, produce menor activación de basófilos y menor liberación de histamina, corroborando así su reducida actividad alergénica mediante pruebas funcionales.

6.2. RETENCIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGÉNICA

Un extracto o proteína alergénica, para poder considerarse un buen extracto hipoalergénico o buen hipoalérgeno, además de reducir o eliminar su alergenidad, tiene que conservar su capacidad inmunogénica [296].

Se probó, mediante los ensayos de proliferación de PBMCs, que el extracto hipoalergénico de gamba obtenido gracias a la digestión con pepsina, preservaba los epítomos de las células T. Si bien los niveles de proliferación alcanzados con el extracto hipoalergénico, SMCoD₆₀, no son muy elevados, éstos son del mismo orden que los obtenidos con el SMCo (**Figura 59**). Estos resultados indican que la mayoría de los epítomos T están presentes en el extracto hipoalergénico de la gamba. Niveles de proliferación similares consiguieron Himly y cols. [297] con un hipoalérgeno de Art v 1 en 20 pacientes alérgicos a Artemisia. Sin embargo, Ball y cols. [298] obtuvieron índices de estimulación mayores al cultivar las PBMCs de cinco pacientes alérgicos a gramíneas, tanto con la molécula rPhl p 1, como con su hipoalérgeno.

Los experimentos de proliferación con PBMCs para determinar la capacidad inmunogénica de un posible candidato para una vacuna, no se deben tener en cuenta de forma aislada, dado que en algunos casos se ha visto que ciertos alérgenos pueden producir proliferaciones similares tanto en pacientes alérgicos como en controles [299-303]. Esto ocurre por ejemplo con Can f 1, alérgeno cuyos péptidos p33-48 y p107-122 poseen igual capacidad de inducir proliferación tanto en PBMCs procedentes de pacientes alérgicos como de sujetos control [304].

Una vez demostrado que el extracto de gamba hipoalergénico, SMCoD₆₀, conserva los epítomos T, se comprobó si éste conservaba la capacidad de generar anticuerpos IgG-alérgeno-específicos (**Figura 60**), de forma similar a como lo hicieron otros autores con otros hipoalérgenos [305].

El hecho de que el extracto hipoalergénico de la gamba sea capaz de producir anticuerpos IgG es importante, pero más relevante aún es el hecho de que estos anticuerpos son capaces de bloquear la unión de la IgE específica frente a las proteínas del extracto de gamba cocida (**Tabla XI**), inhibiendo así la degranulación de las células efectoras y la inflamación medida por IgE. Resultados similares se han documentado con derivados de alérgenos modificados genéticamente [298, 306].

Si bien los niveles medios de inhibición son superiores con el suero del conejo α -SMCo que los obtenidos con el suero del conejo α -SMCoD₆₀, estas diferencias parecen estar condicionadas por los niveles de IgE específica de cada individuo, dado que el paciente con el que se consiguen mayores valores de inhibición con ambos sueros de conejo (paciente 12, **Tabla XI**), posee una IgE específica de 24,2 kU/mL, mientras que con el suero del paciente 14, cuya IgE específica a gamba es >100 kU/mL, las inhibiciones obtenidas son del 100% y 29% con el suero de los conejos α -SMCo y α -SMCoD₆₀, respectivamente. Además, estas diferencias probablemente se deban a que las diluciones de los anti-sueros de conejos empleadas fueron las mismas, pero los títulos de estos anti-sueros eran diferentes.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio permiten obtener un panel más completo de los alérgenos de la gamba, gracias a la identificación de la FBPA, α -actinina, β -actina, y UB como nuevos alérgenos de la gamba *S. melanthero*.

Los datos del elevado número de individuos que presentan síntomas tanto a gamba como a ácaro corrobora la importancia de identificar nuevas proteínas implicadas en la reactividad cruzada entre ambas fuentes alérgicas. Aquí se confirma que esta RC es debida a la TM, y además, se demuestra que la AK y los nuevos alérgenos α -actinina y UB, también son responsables la RC entre ambas fuentes alérgicas.

Gracias a la aproximación experimental de la digestión *in vitro* con pepsina, se consigue obtener un extracto hipoalérgico de la gamba, el cual conserva los epítomos T y que además produce anticuerpos IgG específicos capaces de bloquear la unión de la IgE de los sueros de los pacientes a las proteínas de la gamba.

Este hallazgo ayudaría potencialmente a mejorar el tratamiento de la alergia a gamba, en concreto, y de otros mariscos, en general.

CONCLUSIONES

Analizando los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que:

1. La mayoría de los pacientes que acuden al servicio de alergia por reacciones adversas tras la ingesta de gambas presentan simultáneamente síntomas frente al ácaro, siendo este porcentaje mayor en los pacientes procedentes de Lugo (83%) que en los de Madrid (50%). Los síntomas más comunes en estos individuos fueron la urticaria y angioedema en Madrid y Lugo, respectivamente. Además, se ha demostrado que existe una asociación positiva entre los resultados de la IgE específica a la TM (tanto por InmunoCAP® como por inmunodetección) y los resultados positivos de la PODCCP.
2. Por primera vez se han identificado las proteínas α -actinina, β -actina, FBPA y ubiquitina como nuevos alérgenos de la gamba, colaborando así a la obtención de un panel más completo de los alérgenos de dicha fuente alérgica.
3. Los perfiles alérgicos frente a la gamba y al ácaro difieren en función de la población estudiada, y en función de la sintomatología de los pacientes; esto confirma la importancia de emplear poblaciones bien definidas a la hora de caracterizar los alérgenos principales de una fuente alérgica.
4. La TM es responsable de la RC entre la gamba *S. melanthero* y el ácaro *D. pteronyssinus*, pero también lo son la AK y los nuevos alérgenos de la gamba identificados como α -actinina y ubiquitina.
5. La digestión con pepsina resultó un tratamiento efectivo para la obtención de un extracto hipoalérgico. Dicho extracto posee menor capacidad de unir IgE y menor alergenidad (es decir, produce menor activación de basófilos y menor liberación de histamina). Además, este extracto hipoalérgico conserva los epítomos T y produce anticuerpos IgG específicos capaces de bloquear la unión de la IgE de los sueros de los pacientes a las proteínas alérgicas de la gamba.
6. El extracto hipoalérgico de gamba obtenido posee las características apropiadas para su potencial uso en inmunoterapia.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] von Pirquet C. Allergie. *Munch Med Wochenschr* 1906; 30:457-61.
- [2] Prausnitz C, Küstner H. Studien über überempfindlichkeit. *Centralbl Bakteriell* 1921; 86:160.
- [3] Igea JM. ¿Alergia o atopia?. *Panace@*. Vol. VIII, nº 25. Primer semestre, 2007.
- [4] Pepys JF, Jenkins PA FAU, Festenstein GN FAU, Gregory PH FAU, Lacey ME FAU, Skinner FA. Farmer's lung. Thermophilic actinomycetes as a source of "farmer's lung hay" antigen. *Lancet* 1963; 41:607-11.
- [5] Johansson SG, Bennich H. Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology* 1967; 13(4):381-94.
- [6] Ishizaka K, Ishizaka T. Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 1967; 99(6):1187-98.
- [7] Coombs RRA, Gell PGH. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In: Coombs RRA, ed. *Clinical Aspects of Immunology*, Blackwell Science Publishers, London; 1968:575-96.
- [8] Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujinzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, van Hage-Hamsten M, Wüthrich B; EAACI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001; 56(9):813-24.
- [9] Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(5):832-6.
- [10] Brostoff J, Hall T. Hipersensibilidad de tipo I. En: Roitt I, Brostoff J, Male D, eds. *Inmunología*, 5ª edición. Madrid, Ediciones Harcourt 2000:302-17.
- [11] Gómez E, Mayorga C, Gómez F, Blázquez AB, Díaz-Perales A, Blanca M, Torres MJ. Food Allergy. Management, Diagnosis and Treatment Strategies. *Immunotherapy* 2013; 5(7):755-68.
- [12] Buus S, Sette A, Colon SM, Miles C, Grey HM. The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science* 1987; 235(4794): 1353-8.
- [13] Dahl R, Andersen PS, Chivato T, Valovirta E, de Monchy J. National prevalence of respiratory allergic disorders. *Respir Med* 2004; 98(5):398-403.
- [14] Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annu Rev Med* 2009; 60:261-77.
- [15] Fernández RM. Food allergy in Alergologica-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; 19 (Suppl 2):37-44.
- [16] Sampson HA. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(6):981-9.
- [17] Chapman JA, Bernstein IL, Lee RE, Oppenheimer J, Nicklas RA, Portnoy JM, Sicherer SH, Schuller DE, Spector SL, Khan D, Lang D, Simon RA, Tilles SA, Blessing-Moore J, Wallace D, Teuber SS. Food allergy: a practice parameter. *Annals of Allergy Asthma & Immunology* 2006; 96:S1-68.
- [18] Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005; 115:3-12.
- [19] Burks AW, Sampson HA. Food allergies in children. *Current Problems in Pediatrics* 1993; 23:230-52.
- [20] Vukavic T. Timing of the gut closure. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1984; 3:700-3.
- [21] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology 6th edn. WB Saunders Company, Philadelphia (USA), 2009.
- [22] Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011; 127:18-27.
- [23] Romagnani S. Human Th1 and Th2 Subsets - Doubt no more. *Immunology Today* 1991; 12:256-7.
- [24] Rolland JM, Gardner LM, O'Hehir RE. Functional regulatory T cells and allergen immunotherapy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2010; 10:559-66.
- [25] Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. Inhibition of the allergic response by regulatory T cells. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2006; 6:12-6.
- [26] O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunological Reviews* 2008; 223:114-31.
- [27] Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review of Immunology* 1998; 16:137-61.

- [28] Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC, Khoury S, Oukka M, Kuchroo VK. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3(+) T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9(+) IL-10(+) Foxp3(-) effector T cells. *Nature Immunology* 2008; 9:1347-55.
- [29] Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology* 2008; 9:1341-46.
- [30] Leonard SA, Martos G, Wang W, Nowak-Węgrzyn A, Berin MC. Oral immunotherapy induces local protective mechanisms in the gastrointestinal mucosa. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 129(6):1579-87.
- [31] Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: Novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2005; 116:961-8.
- [32] Burks W. Skin manifestations of food allergy. *Pediatrics*. 2003; 111:1617-24.
- [33] Crespo JF, Pascual C, Burks AW, Helm RM, Esteban MM. Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. *Pediatr Allergy Immunol* 1995; 6:39-43.
- [34] Rancé F, Kanny G, Dutau G, Moneret-Vautrin DA. Food hypersensitivity in children: clinical aspects and distribution of allergens. *Pediatr Allergy Immunol* 1999; 10:33-8.
- [35] Wuthrich B. Food-induced cutaneous adverse reactions. *Allergy* 1998; 53:131-5.
- [36] Aplicación de la tecnología microarray al manejo diagnóstico de la alergia a proteínas de la leche de la vaca. Tesis Doctoral, Inmaculada Ceredo Carballo. 2009.
- [37] Amin S, Tanglertsampan C, Maibach HI. Contact urticaria syndrome: 1997. *Am J Contact Dermat* 1997; 8:15-9.
- [38] Burks AW, Mallory SB, Williams LW, Shirrell MA. Atopic dermatitis: clinical relevance of food hypersensitivity reactions. *J Pediatr* 1988; 113:447-51.
- [39] Sampson HA. Jerome Glaser lectureship. The role of food allergy and mediator release in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81:635-45.
- [40] Atkins FM, Steinberg SS, Metcalfe DD. Evaluation of immediate adverse reactions to foods in adult patients. I. Correlation of demographic, laboratory, and prick skin test data with response to controlled oral food challenge. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75:348-55.
- [41] Sicherer SH. Clinical aspects of gastrointestinal food allergy in childhood. *Pediatrics* 2003; 111:1609-16.
- [42] Sampson HA. Food allergy accurately identifying clinical reactivity. *Allergy* 2005; 60 (Suppl 79):19-24.
- [43] Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, Bigi A, Ansaloni R. The oral allergy syndrome. *Ann Allergy* 1988; 61:47-52.
- [44] Nekam KL. Nutritional triggers in asthma. *Acta Microbiol Immunol Hung* 1998; 45:113-7.
- [45] Onorato J, Merland N, Terral C, Michel FB, Bousquet J. Placebo-controlled double-blind food challenge in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78:1139-46.
- [46] James JM, Bernhisel-Broadbent J, Sampson HA. Respiratory reactions provoked by double-blind food challenges in children. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:59-64.
- [47] Roberts G, Patel N, Levi-Schaffer F, Habibi P, Lack G. Food allergy as a risk factor for life-threatening asthma in childhood: a case-controlled study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 112(1):168-74.
- [48] Decker WW, Campbell RL, Manivannan V, Luke A, St Sauver JL, Weaver A, Bellolio MF, Bergstralh EJ, Stead LG, Li JT. The etiology and incidence of anaphylaxis in Rochester, Minnesota: a report from the Rochester Epidemiology Project. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:1161-5.
- [49] Lieberman P, Camargo CA Jr, Bohlke K, Jick H, Miller RL, Sheikh A, Simons FE. Epidemiology of anaphylaxis: findings of the American College of Allergy, Asthma and Immunology Epidemiology of Anaphylaxis Working Group. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97:596-602.
- [50] Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med* 1992; 327:380-4.
- [51] Sheikh A, Alves B. Hospital admissions for acute anaphylaxis: time trend study. *BMJ* 2000; 320:1441.
- [52] Simon MR, Mulla ZD. A population-based epidemiologic analysis of deaths from anaphylaxis in Florida. *Allergy* 2008; 63:1077-83.
- [53] Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):S116-25.
- [54] Simons FE, Frew AJ, Ansotegui IJ, Bochner BS, Golden DB, Finkelman FD, Leung DY, Lotvall J, Marone G, Metcalfe DD, Müller U, Rosenwasser LJ, Sampson HA, Schwartz LB, van Hage M, Walls AF. Risk assessment in anaphylaxis: current and future approaches. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:S2-24.
- [55] Lin RY, Anderson AS, Shah SN, Nuruzzaman F. Increasing anaphylaxis hospitalizations in the first 2 decades of life: New York State, 1990 -2006. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 101:387-93.
- [56] Sampson HA, Munoz-Furlong A, Bock SA, Schmitt C, Bass R, Chowdhury BA, Decker WW, Furlong TJ, Galli SJ, Golden DB, Gruchalla RS, Harlor AD Jr, Hepner DL, Howarth M, Kaplan AP, Levy JH, Lewis

- LM, Lieberman PL, Metcalfe DD, Murphy R, Pollart SM, Pumphrey RS, Rosenwasser LJ, Simons FE, Wood JP, Camargo CA Jr. Symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:584-91.
- [57] Bhalla PL, Singh MB. Biotechnology-based allergy diagnosis and vaccination. *Trends Biotechnol* 2008; 26(3):153-61.
- [58] Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre Alergias Alimentarias. Manuel Martín Esteban, Arturo Anadón Navarro, Elia Teso Canales. AESAN-2007-001.
- [59] Comité de reacciones adversas a alimentos. SEAIC. Metodología diagnóstica en la alergia a los alimentos (Artículo especial). *Alergol Immunol Clin* 2009; 14:50-62.
- [60] Bock SA, Sampson HA, Atkins FM, Zeiger RS, Lehrer S, Sachs M, Bush RK, Metcalfe DD. Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: a manual. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82:986-97.
- [61] Rosen JP, Selcow JE, Mendelson LM, Grodofsky MP, Factor JM, Sampson HA. Skin testing with natural foods in patients suspected of having food allergies: is it a necessity?. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93:1068-70.
- [62] Sampson HA. Comparative study of commercial food antigen extracts for the diagnosis of food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82:718-26.
- [63] Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, Blanco C, Ebner C, Hourihane J, Knulst AC, Moneret-Vautrin DA, Nekam K, Niggemann B, Osterballe M, Ortolani C, Ring J, Schnopp C, Werfel T; European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 2004; 59:690-7.
- [64] González-Mancebo E, de la Hoz B. Técnicas para enmascarar alimentos. *Alergol Immunol Clín* 2004; 19(Extr. 2):177-8.
- [65] Cuesta-Herranz J. Problemática en el diagnóstico de la alergia a alimentos. Joint Symposium SEAIC-EAACI. *Alergol Immunol Clin* 2001; 16(Extraordinario Núm. 2):116-36.
- [66] Deinhofer K, Sevcik H, Balic N, Harwanegg C, Hiller R, Rumpold H, Mueller MW, Spitzauer S. Microarrayed allergens for IgE profiling. *Methods* 2004; 32(3):249-54.
- [67] Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, Mueller MW, Kraft D, Spitzauer S, Valenta R. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(1):7-13.
- [68] Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, Huber M, Schmidt WM, Twardosz A, Barletta B, Becker WM, Blaser K, Breiteneder H, Chapman M, Cramer R, Duchêne M, Ferreira F, Fiebig H, Hoffmann-Sommergruber K, King TP, Kleber-Janke T, Kurup VP, Lehrer SB, Lidholm J, Müller U, Pini C, Reese G, Scheiner O, Scheynius A, Shen HD, Spitzauer S, Suck R, Swoboda I, Thomas W, Tinghino R, Van Hage-Hamsten M, Virtanen T, Kraft D, Müller MW, Valenta R. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J* 2002; 16(3):414-6.
- [69] Kim TE, Park SW, Cho NY, Choi SY, Yong TS, Nahm BH, Lee S, Noh G. Quantitative measurement of serum allergen-specific IgE on protein chip. *Exp Mol Med* 2002; 34(2):152-8.
- [70] Joint Task Force on Practice Parameters; American Academy of Allergy, Asthma and Immunology; American College of Allergy, Asthma and Immunology; Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology. Allergen immunotherapy: a practice parameter second update. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:S25-85.
- [71] Durham SR. Allergen immunotherapy (desensitisation) for allergic diseases. *Clin Med* 2006; 6(4):348-51.
- [72] Nelson HS. Specific immunotherapy with allergen mixes: what is the evidence?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009; 9(6):549-53.
- [73] Bolhaar ST FAU, Zuidmeer LF, Ma YF, Ferreira FF, Bruijnzeel-Koomen CA FAU - Hoffmann-Sommergruber, Hoffmann-Sommergruber KF, van Ree R, Knulst AC. A mutant of the major apple allergen, Mal d 1, demonstrating hypo-allergenicity in the target organ by double-blind placebo-controlled food challenge. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(12):1638-44.
- [74] Nelson HS, Lahr J, Rule R, Bock A, Leung D. Treatment of anaphylactic sensitivity to peanuts by immunotherapy with injections of aqueous peanut extract. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(6 Pt 1):744-51.
- [75] Niederberger V, Pauli G, Gronlund H, Froschl R, Rumpold H, Kraft D, Valenta R, Spitzauer S. Recombinant birch pollen allergens (rBet v 1 and rBet v 2) contain most of the IgE epitopes present in birch, alder, hornbeam, hazel, and oak pollen: a quantitative IgE inhibition study with sera from different populations. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102(4 Pt 1):579-91.

- [76] Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, Breiteneder H, Valenta R, Ebner H, Kraft D, Scheiner O. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95(5 Pt 1):962-9.
- [77] Enrique E, Pineda F, Malek T, Bartra J, Basagana M, Tella R, Castelló JV, Alonso R, de Mateo JA, Cerdá-Trias T, San Miguel-Moncín Mdel M, Monzón S, García M, Palacios R, Cisteró-Bahíma A. Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(5):1073-9.
- [78] de Boissieu D, Dupont C. Sublingual immunotherapy for cow's milk protein allergy: a preliminary report. *Allergy* 2006; 61(10):1238-9.
- [79] Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Brewe F, Wahn U, Niggemann B, Beyer K. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy* 2007; 62(11):1261-9.
- [80] Bannon GA, Cockrell G, Connaughton C, West CM, Helm R, Stanley JS, King N, Rabjohn P, Sampson HA, Burks AW. Engineering, characterization and *in vitro* efficacy of the major peanut allergens for use in immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124(1-3):70-2.
- [81] Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, West CM, Sampson HA, Burks AW, Bannon GA. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J Clin Invest* 1999; 103(4):535-42.
- [82] Swoboda I, Bugajska-Schretter A, Linhart B, Verdino P, Keller W, Schulmeister U, Sperr WR, Valent P, Peltre G, Quirce S, Douladiris N, Papadopoulos NG, Valenta R, Spitzauer S. A recombinant hypoallergenic parvalbumin mutant for immunotherapy of IgE-mediated fish allergy. *J Immunol* 2007; 178(10):6290-6.
- [83] Ma Y, Gadermaier G, Bohle B, Bolhaar S, Knulst A, Markovic-Housley Z, Breiteneder H, Briza P, Hoffmann-Sommergruber K, Ferreira F. Mutational analysis of amino acid positions crucial for IgE-binding epitopes of the major apple (*Malus domestica*) allergen, Mal d 1. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 139(1):53-62.
- [84] Zuidmeer-Jongejan L, Fernandez-Rivas M, Poulsen LK, Neubauer A, Asturias J, Blom L, Boye J, Bindeslev-Jensen C, Clausen M, Ferrara R, Garosi P, Huber H, Jensen BM, Koppelman S, Kowalski ML, Lewandowska-Polak A, Linhart B, Maillere B, Mari A, Martinez A, Mills CE, Nicoletti C, Opstelten DJ, Papadopoulos NG, Portoles A, Rigby N, Scala E, Schnoor HJ, Sigursdottir S, Stavrulakis G, Stolz F, Swoboda I, Valenta R, van den Hout R, Versteeg SA, Witten M, van Ree R. FAST: Towards safe and effective subcutaneous immunotherapy of persistent life-threatening food allergies. *Clin Transl Allergy* 2012; 2(1):5.
- [85] Pellaton C, Perrin Y, Boudousquie C, Barbier N, Wassenberg J, Corradin G, Thierry AC, Audran R, Reymond C, Spertini F. Novel birch pollen specific immunotherapy formulation based on contiguous overlapping peptides. *Clin Transl Allergy* 2013; 3(1):17.
- [86] Slater JE, Paupore E, Zhang YT, Colberg-Poley AM. The latex allergen Hev b 5 transcript is widely distributed after subcutaneous injection in BALB/c mice of its DNA vaccine. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102(3):469-75.
- [87] Hartl A, Kiesslich J, Weiss R, Bernhaupt A, Mostböck S, Scheiblhofer S, Ebner C, Ferreira F, Thalhammer J. Immune responses after immunization with plasmid DNA encoding Bet v 1, the major allergen of birch pollen. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(1 Pt 1):107-13.
- [88] Toda MF, Kasai MF, Hosokawa HF, Nakano NF, Taniguchi YF, Inouye S FAU - Kaminogawa S, Takemori T, Sakaguchi M. DNA vaccine using invariant chain gene for delivery of CD4+ T cell epitope peptide derived from Japanese cedar pollen allergen inhibits allergen-specific IgE response. *Eur J Immunol* 2002; 32(6):1631-9.
- [89] Roy K, Mao HQ, Huang SK, Leong KW. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med* 1999; 5(4):387-91.
- [90] Tighe H, Takabayashi K, Schwartz D, Van Nest G, Tuck S, Eiden JJ, Kagey-Sobotka A, Creticos PS, Lichtenstein LM, Spiegelberg HL, Raz E. Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen Amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *Eur J Immunol* 2000; 32(6):1631-9.
- [91] Broide DH. Immunostimulatory sequences of DNA and conjugates in the treatment of allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005; 5(3):182-5.
- [92] Casale TB, Condemi J, LaForce C, Nayak A, Rowe M, Watrous M, McAlary M, Fowler-Taylor A, Racine A, Gupta N, Fick R, Della Cioppa G; Omalizumab Seasonal Allergic Rhinitis Trial Group. Effect of omalizumab on symptoms of seasonal allergic rhinitis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 286(23):2956-67.

- [93] Kuehr J, Brauburger J, Zielen S, Schauer U, Kamin W, Von Berg A, Leupold W, Bergmann KC, Rolinck-Werninghaus C, Gräve M, Hultsch T, Wahn U. Efficacy of combination treatment with anti-IgE plus specific immunotherapy in polysensitized children and adolescents with seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109(2):274-80.
- [94] Hamelmann E, Rolinck-Werninghaus C, Wahn U. Is there a role for anti-IgE in combination with specific allergen immunotherapy?. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3(6):501-10.
- [95] Frossard CP, Steidler L, Eigenmann PA. Oral administration of an IL-10-secreting *Lactococcus lactis* strain prevents food-induced IgE sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(4):952-9.
- [96] Ando T, Hatsushika K, Wako M, Ohba T, Koyama K, Ohnuma Y, Luo J, Wyss-Coray T, Nakao A. Orally administered TGF-beta is biologically active in the intestinal mucosa and enhances oral tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(4):916-23.
- [97] Stein ML, Collins MH, Villanueva JM, Kushner JP, Putnam PE, Buckmeier BK, Filipovich AH, Assa'ad AH, Rothenberg ME. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy for eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(6):1312-9.
- [98] Li XM. Traditional Chinese herbal remedies for asthma and food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(1):25-31.
- [99] Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(2):228-38.
- [100] van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akkerdaas J, Milazzo JP, Loutelier-Bourhis C, Rayon C, Villalba M, Koppelman S, Aalberse R, Rodriguez R, Faye L, Lerouge P. Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem* 2000; 275(15):11451-8.
- [101] Emara M, Royer PJ, Abbas Z, Sewell HF, Mohamed GG, Singh S, Peel S, Fox J, Shakib F, Martinez-Pomares L, Ghaemmaghani AM. Recognition of the major cat allergen Fel d 1 through the cysteine-rich domain of the mannose receptor determines its allergenicity. *J Biol Chem* 2011; 286(15):13033-40.
- [102] Aalberse RC. Structural features of allergenic molecules. *Chem Immunol Allergy* 2006; 91:134-46.
- [103] Radauer C, Breiteneder H. Evolutionary biology of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(3):518-25.
- [104] Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(4):847-52.
- [105] Weber RW. Allergens. *Primary Care; Clinics in Office Practice* 1987; 14(3):435-45.
- [106] Taylor SL, Lemanske RF, Jr., Bush RK, Busse WW. Food allergens: structure and immunologic properties. *Ann Allergy* 1987; 59(5 Pt 2):93-9.
- [107] Alessandri C, Zennaro D, Zaffiro A, Mari A. Molecular allergology approach to allergic diseases in the paediatric age. *Italian Journal of Pediatrics* 2009; 35(1):29.
- [108] Huby RD, Dearman RJ, Kimber I. Why are some proteins allergens?. *Toxicological Sciences* 2000; 55(2):235-46.
- [109] Mygind N, Dahl R, Pedersen S, Thestrup-Pedersen K. Allergens. Essential allergy. Oxford, U.K.: Blackwell Science, 1996: 81.
- [110] Fernandez-Rivas M. Alergia a Alimentos: patrones de respuesta clínica a los alérgenos alimentarios. Comité de Reacciones Adversas a Alimentos de la SEAIC. *Alergol Immunol Clin* 2003; 18:119-20.
- [111] Marsh DG FAU, Goodfriend LF, King TP FAU, Lowenstein HF, Platts-Mills TA. Allergen nomenclature. *Bull World Health Organ* 1986; 64(5):767-74.
- [112] King TP, Hoffman DF, Lowenstein HF, Marsh DG, Platts-Mills TA, Thomas W. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105(3):224-33.
- [113] Larramendi CH. Food allergy diagnosis: are there any missing factors? A theoretical approach. *Med Hypotheses* 2003; 60(5):731-8.
- [114] Metcalfe DD, Sampson HA, Simon RA. Food Allergy. Adverse reactions to foods and food additives. 2nd ed. Cambridge, Mass, USA: Blackwell Science, 1997.
- [115] Sicherer SH. Determinants of systemic manifestations of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(5 Suppl):S251-7.
- [116] Burks W, Helm R, Stanley S, Bannon GA. Food allergens. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1(3):243-8.
- [117] Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, de Vries SC, Gautier MF, Ciurana CL, Verbeek E, Mohammadi T, Knul-Brettlova V, Akkerdaas JH, Bulder I, Aalberse RC, van Ree R. Lipid transfer protein: a panallergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122(1):20-32.

- [118] Fernandez-Rivas M, Gonzalez-Mancebo E, Rodriguez-Perez R, Benito C, Sanchez-Monge R, Salcedo G, Alonso MD, Rosado A, Tejedor MA, Vila C, Casas ML. Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(4):789-95.
- [119] Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(1 Pt 1):27-36.
- [120] Breiteneder H, Mills EN. Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(1):14-23.
- [121] Pascual CY, Crespo JF, Martin-Esteban M. The relevance of cross-reactivity in pediatric allergy. *Clin Rev Allergy Immunol* 1997; 15(4):449-60.
- [122] Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, Wopfner N, Mari A. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy* 2004; 59(3):243-67.
- [123] Van Ree R, Voitenko V, van Leeuwen WA, Aalberse RC. Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 98(2):97-104.
- [124] Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 964:47-68.
- [125] Valenta R, Duchene M, Ebner C, Valent P, Sillaber C, Deviller P et al. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med* 1992; 175(2):377-85.
- [126] Casquete-Román E, Rosado-Gil T, Postigo I, Guisantes JA, Fernández M, Torres HE, Martínez-Quesada J. Profilin cross-reactive panallergen causes latex sensitization in the pediatric population allergic to pollen. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2012; 109(3):215-9.
- [127] Wagner S, Breiteneder H. The latex-fruit syndrome. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(Pt 6):935-40.
- [128] Diez-Gomez ML, Quirce S, Cuevas M, Sanchez-Fernandez C, Baz G, Moradiellos FJ, Martinez A. Fruit-pollen-latex cross-reactivity: implication of profilin (Bet v 2). *Allergy* 1999; 54(9):951-61.
- [129] Vieths S, Luttkopf D, Reindl J, Anliker MD, Wuthrich B, Ballmer-Weber BK. Allergens in celery and zucchini. *Allergy* 2002; 57 (Suppl 72):100-5.
- [130] Sánchez-Monge R, Lombardero M, García-Sellés FJ, Barber D, Salcedo G. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(3 Pt 1): 514-9.
- [131] Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Ispano M, Monza M, Baroglio C, Scibola E, Ansaloni R, Incorvaia C, Conti A. The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(3 Pt 1):520-6.
- [132] Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Caldironi G, Barocci F, van Ree R. Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy* 2002; 57(10):900-6.
- [133] Pascual CY, Reche M, Fiandor A, Valbuena T, Cuevas T, Esteban MM. Fish allergy in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19(7):573-9.
- [134] Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, Metcalfe DD, Rao PV. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *J Immunol* 1993; 151(10):5354-63.
- [135] Daul CB, Slattey M, Reese G, Lehrer SB. Identification of the Major Brown Shrimp (*Penaeus aztecus*) Allergen as the muscle protein tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105:49-55.
- [136] Sahabudin S, Misnan R, Yadzir ZH, Mohamad J, Abdullah N, Bakhtiar F, Murad S. Identification of Major and Minor Allergens of Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*) and King Prawn (*Penaeus latisulcatus*). *Malays J Med Sci* 2011; 18(3):27-32.
- [137] Yadzir ZH, Misnan R, Murad S. Identification of tropomyosin as major allergen of white squid (*Loligo edulis*) by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2012; 43(1):185-91.
- [138] Myrset HR, Barletta B, Di Felice G, Egaas E, Dooper MM. Structural and immunological characterization of recombinant Pan b 1, a major allergen of northern shrimp, *Pandalus borealis*. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 160(3):221-32.
- [139] Rosmilah M, Shahnaz M, Zailatul H MY, Noormalin A, Normilah I. Identification of tropomyosin and arginine kinase as major allergens of *Portunus pelagicus* (blue swimming crab). *Trop Biomed* 2012; 29(3):467-78.
- [140] Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2012.
- [141] Jeebhay MF, Robins TG, Lherer SB, Lopata AL. Occupational seafood allergy: a review. *Occup Environ Med* 2001; 58:553-62.
- [142] Lopata AL, Potter PC. Allergy and other adverse reactions to seafood. *ACI international* 2000; 12:271-81.
- [143] Castillo R, Carrillo T, Blanco C, Quiralte J, Cuevas M. Shellfish hypersensitivity: clinical and immunological characteristics. *Allergol Immunopathol* 1994; 22:83-87.

- [144] Daul CB, Morgan J, Lehrer S. Hypersensitivity reactions to crustacean and molluscs. *Clinical Reviews in Allergy* 1993; 11:201-22.
- [145] Sicherer SH, Muñoz-Furlog A, Sampson HA. Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:159-65.
- [146] Woods RK, Thien F, Raven J, Walters EH, Abramson M. Prevalence of food allergies in young adults and their relationship to asthma, nasal allergies, and eczema. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88:183-9.
- [147] Castillo R, Delgado J, Quirarte J, Blanco C, Carrillo T. Food hypersensitivity among adult patients: epidemiological and clinical aspects. *Allergol Immunopathol* 1996; 24(3):93-7.
- [148] Abdel Rahman AM, Kamath SD, Gagné S, Lopata AL, Helleur R. Comprehensive proteomics approach in characterizing and quantifying allergenic proteins from northern shrimp: toward better occupational asthma prevention. *J Proteome Res* 2013; 12(2):647-56.
- [149] Lopata AL, Jeebhay MF. Airborne seafood allergens as a cause of occupational allergy and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2013; 13(3):288-97.
- [150] Hoffman DR, Day ED Jr, Miller JS. The major heat stable allergen of shrimp. *Ann Allergy* 1981; 47(1):17-22.
- [151] Leung PS, Chen YC, Mykles DL, Chow WK, Li CP, Chu KH. Molecular identification of the lobster muscle protein tropomyosin as a seafood allergen. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1998; 7(1):12-20.
- [152] Reese G, Jeoung BJ, Daul C, Lehrer S. Characterization of recombinant Shrimp Allergen Pen a 1(tropomyosin). *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113:240-2.
- [153] Subba Rao PV, Rajagopal D, Ganesh KA. B- and T-cell epitopes of tropomyosin, the major shrimp allergen. *Allergy* 1998; 53:44-7.
- [154] Ayuso R, Sánchez-García S, Lin J, Fu Z, Ibáñez MD, Carrillo T, Blanco C, Goldis M, Bardina L, Sastre J, Sampson HA. Greater epitope recognition of shrimp allergens by children than by adults suggests that shrimp sensitization decreases with age. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(6):1286-93.
- [155] Ishikawa M, Suzuki F, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K. Identification of tropomyosin as a major allergen in the octopus *Octopus vulgaris* and elucidation of its IgE-binding epitopes. *Fisheries Science* 2001; 67(5):934-42.
- [156] Leung PS, Chu KH. cDNA cloning and molecular identification of the major oyster allergen from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(8):1287-94.
- [157] Arrieta I, del Barrio M, Vidarte L, del Pozo V, Pastor C, Gonzalez-Cabrero J, Cárdaña B, Rojo M, Mínguez A, Cortegano I, Gallardo S, Aceituno E, Palomino P, Vivanco F, Lahoz C. Molecular cloning and characterization of an IgE-reactive protein from *Anisakis simplex*: Ani s 1. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 107(2):263-8.
- [158] Acevedo N, Erler A, Briza P, Puccio F, Ferreira F, Caraballo L. Allergenicity of *Ascaris lumbricoides* tropomyosin and IgE sensitization among asthmatic patients in a tropical environment. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 154(3):195-206.
- [159] Caraballo L, Acevedo N. Allergy in the tropics: the impact of cross-reactivity between mites and ascaris. *Front Biosci* 2011; 3:51-64.
- [160] Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, Chow LP. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J Immunol* 2003; 170:445-53.
- [161] Binder M, Mahler V, Hayek B, Sperr WR, Schöller M, Prozell S, Wiedermann G, Valent P, Valenta R, Duchêne M. Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen. *J Immunol* 2001; 167(9):5470-7.
- [162] Misnan R, Murad S, Yazdir ZH, Abdullah N. Identification of the major allergens of *Charybdis feriatus* (red crab) and its cross-reactivity with *Portunus pelagicus* (blue crab). *Asian Pac J Allergy Immunol* 2012; 30(4):285-93.
- [163] Sookrung N, Chaicumpa W, Tungtrongchitr A, Vichyanond P, Bunnag C, Ramasoota P, Tongtawe P, Sakolvaree Y, Tapchaisri P. *Periplaneta americana* arginine kinase as a major cockroach allergen among Thai patients with major cockroach allergies. *Environ Health Perspect* 2006; 114(6):875-80.
- [164] Bobolea I, Barranco P, Pastor-Vargas C, Iraola V, Vivanco F, Quirce S. Arginine kinase from the cellar spider (*Holocnemus pluchei*): a new asthma-causing allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155(2):180-6.
- [165] Liu Z, Xia L, Wu Y, Xia Q, Chen J, Roux KH. Identification and characterization of an arginine kinase as a major allergen from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 150(1):8-14.
- [166] Popova-Butler A, Dean DH. Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. *J Insect Physiol* 2009; 55(3):264-72.

- [167] Shen HW, Cao MJ, Cai QF, Ruan MM, Mao HY, Su WJ, Liu GM. Purification, cloning, and immunological characterization of arginine kinase, a novel allergen of *Octopus fangsiao*. *J Agric Food Chem* 2012; 60(9):2190-9.
- [168] Ayuso R, Grishina G, Bardina L, Carrillo T, Blanco C, Ibáñez MD, Sampson HA, Beyer K. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122(4):795-802.
- [169] <http://www.allergome.com>.
- [170] González-Mancebo E, Pastor C, González-de-Olano D, Gandolfo-Cano M, Melendez A, Cuesta J, Zapatero A, Bartolomé B. Identification of allergens in chicken meat allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011; 21(4):326-7.
- [171] Shiomi K, Sato Y, Hamamoto S, Mita H, Shimakura K. Sarcoplasmic calcium-binding protein: identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146(2):91-8.
- [172] Ayuso R, Grishina G, Ibáñez MD, Blanco C, Carrillo T, Bencharitiwong R, Sánchez S, Nowak-Węrzyn A, Sampson HA. Sarcoplasmic calcium-binding protein is an EF-hand-type protein identified as a new shrimp allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124(1):114-20.
- [173] Chen HL, Cao MJ, Cai QF, Su WJ, Mao HY, Liu GM. Purification and characterisation of sarcoplasmic calcium-binding protein, a novel allergen of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Food Chem* 2013; 139(1-4):213-23.
- [174] Mita H, Koketsu A, Ishizaki S, Shiomi K. Molecular cloning and functional expression of allergenic sarcoplasmic calcium-binding proteins from *Penaeus* shrimps. *J Sci Food Agric* 2013; 93(7):1737-42.
- [175] Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 2000; 80(3):1215-65.
- [176] Ikura M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci* 1996; 21(1):14-7.
- [177] Heizmann CW, Hunziker W. Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *Trends Biochem Sci* 1991; 16(3):98-103.
- [178] Ma Y, Griesmeier U, Susani M, Radauer C, Briza P, Erler A, Bublin M, Alessandri S, Himly M, Vázquez-Cortés S, de Arellano IR, Vassilopoulou E, Saxoni-Papageorgiou P, Knulst AC, Fernández-Rivas M, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H. Comparison of natural and recombinant forms of the major fish allergen parvalbumin from cod and carp. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52(Suppl 2):S196-207.
- [179] Bauermeister K, Wangorsch A, Garoffo LP, Reuter A, Conti A, Taylor SL, Lidholm J, Dewitt AM, Enrique E, Vieths S, Holzhauser T, Ballmer-Weber B, Reese G. Generation of a comprehensive panel of crustacean allergens from the North Sea Shrimp Crangon crangon. *Mol Immunol* 2011; 48(15-16):1983-92.
- [180] Hindley J, Wünschmann S, Satinover SM, Woodfolk JA, Chew FT, Chapman MD, Pomés A. Bla g 6: a troponin C allergen from *Blattella germanica* with IgE binding calcium dependence. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(6):1389-95.
- [181] Jeong KY, Kim CR, Un S, Yi MH, Lee IY, Park JW, Hong CS, Yong TS. Allergenicity of recombinant troponin C from *Tyrophagus putrescentiae*. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 151(3):207-13.
- [182] Posch A, Chen Z, Wheeler C, Dunn MJ, Raulf-Heimsoth M, Baur X. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99(3):385-95.
- [183] Pastor C, Cuesta-Herranz J, Cases B, Pérez-Gordo M, Figueredo E, de las Heras M, Vivanco F. Identification of major allergens in watermelon. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149(4):291-8.
- [184] Sander I, Rozynek P, Rihs HP, van Kampen V, Chew FT, Lee WS, Kotschy-Lang N, Merget R, Brüning T, Raulf-Heimsoth M. Multiple wheat flour allergens and cross-reactive carbohydrate determinants bind IgE in baker's asthma. *Allergy* 2011; 66(9):1208-15.
- [185] Chen YH, Lee MF, Lan JL, Chen CS, Wang HL, Hwang GY, Wu CH. Hypersensitivity to *Forcipomyia taiwana* (biting midge): clinical analysis and identification of major For t 1, For t 2 and For t 3 allergens. *Allergy* 2005; 60(12):1518-23.
- [186] Nakamura R, Satoh R, Nakajima Y, Kawasaki N, Yamaguchi T, Sawada J, Nagoya H, Teshima R. Comparative study of GH-transgenic and non-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*) allergenicity and proteomic analysis of amago salmon allergens. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009; 55(3):300-8.
- [187] Pérez-Gordo M, Pastor Vargas C, Cases B, De Las Heras M, Sanz A, Vivanco F, Cuesta-Herranz J. New allergen involved in a case of allergy to *Solea solea*, common sole. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010; 104(4):352-3.

- [188] Chuang JG, Su SN, Chiang BL, Lee HJ, Chow LP. Proteome mining for novel IgE-binding proteins from the German cockroach (*Blattella germanica*) and allergen profiling of patients. *Proteomics* 2010; 10(21):3854-67.
- [189] Piboonpocanun S, Jirapongsananuruk O, Tipayanon T, Boonchoo S, Goodman RE. Identification of hemocyanin as a novel non-cross-reactive allergen from the giant freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55(10):1492-8.
- [190] Ahmed A, Minhas K, Namood-E-Sahar, Aftab O, Khan FS. In Silico Identification of Potential American Cockroach (*Periplaneta americana*) Allergens. *Iran J Public Health* 2010; 39(3):109-15.
- [191] Guilloux L, Vuitton DA, Delbourg M, Lagier A, Adessi B, Marchand CR, Ville G. Cross-reactivity between terrestrial snails (*Helix* species) and house-dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*). II. In vitro study. *Allergy* 1998; 53(2):151-8.
- [192] Pascual CY, Crespo JF, San MS, Ornia N, Ortega N, Caballero T, Muñoz-Pereira M, Martín-Esteban M. Cross-reactivity between IgE-binding proteins from Anisakis, German cockroach, and chironomids. *Allergy* 1997; 52(5):514-20.
- [193] Santos AB, Chapman MD, Aalberse RC, Vailes LD, Ferriani VP, Oliver C, Rizzo MC, Naspitz CK, Arruda LK. Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:329-337.
- [194] Gámez C, Sánchez-García S, Ibáñez MD, López R, Aguado E, López E, Sastre B, Sastre J, del Pozo V. Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy. *Allergy* 2011; 66(10):1375-83.
- [195] Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119:247-58.
- [196] García JC, Matheu V, Sánchez I, Seoane J. Técnicas diagnósticas in vivo. En: Peláez A, Dávila IJ, eds. Tratado de Alergología. Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. Madrid, Editorial Ergon 2007: 425-47.
- [197] Malling HJ. Methods of skin testing. En: Dreborg S, Frew A. Allergen standardisation and skin tests. Position paper. *Allergy* 1993; 48:55-6.
- [198] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72:248-54.
- [199] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-5.
- [200] Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Boucherie H, Mann M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(25):14440-5.
- [201] Gobom J, Mueller M, Egelhofer V, Theiss D, Lehrach H, Nordhoff E. A calibration method that simplifies and improves accurate determination of peptide molecular masses by MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 2002; 74(15):3915-23.
- [202] Kunimoto A, Sisino T, Sakai K, Matsumoto T, Takahashi K, Yamashita H, Hiemori M, Tsuji H, Kimoto M. Molecular cloning and allergenicity of Pen j 1, a major allergen of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73(4):840-8.
- [203] Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):S116-25.
- [204] Pajno GB, Caminiti L, Salzano G, Crisafulli G, Aversa T, Messina MF, Wasniewska M, Passalacqua G. Comparison between two maintenance feeding regimens after successful cow's milk oral desensitization. *Pediatr Allergy Immunol* 2013; 24(4):376-81.
- [205] García-Ara C, Pedrosa M, Belver MT, Martín-Muñoz MF, Quirce S, Boyano-Martínez T. Efficacy and safety of oral desensitization in children with cow's milk allergy according to their serum specific IgE level. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2013; 110(4):290-4.
- [206] Khoriaty E, Umetsu DT. Oral immunotherapy for food allergy: towards a new horizon. *Allergy Asthma Immunol Res* 2013; 5(1):3-15.
- [207] Domínguez C, Ojeda I, Crespo JF, Pascual C, Ojeda A, Martín-Esteban M. Allergic reactions following skin contact with fish. *Allergy Asthma Proc* 1996; 17(2):83-7.
- [208] Sampson HA, Ho DG. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100(4):444-51.
- [209] Domínguez C, Ojeda I, Crespo JF, Pascual C, Ojeda A. Allergic reactions following skin contact with fish. *Allergy and Asthma Proceedings* 1996; 17(2):83-7.
- [210] Clark S, Bock SA, Gaeta TJ, Brenner BE, Cydulka RK, Camargo CA. Multicenter study of emergency department visits for food allergies. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:347-52.

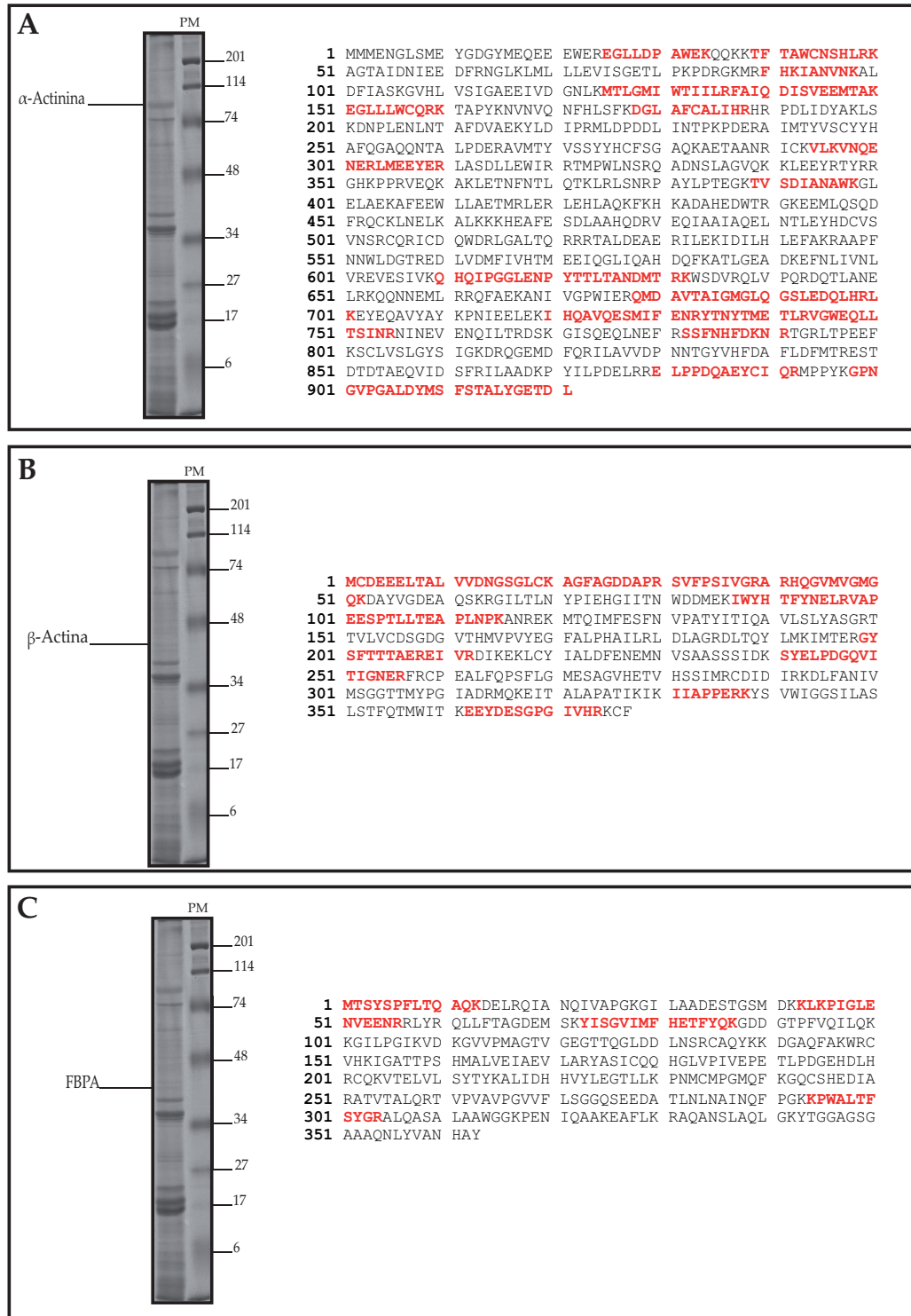
- [211] Ross MP, Ferguson M, Street D, Klontz K, Schroeder T, Luccioli S. Analysis of food-allergic and anaphylactic events in the national electronic injury surveillance system. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:166-71.
- [212] Piromrat K, Chinratanapisit S, Trathong S. Anaphylaxis in an emergency department: a 2-year study in a tertiary-care hospital. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2008; 26:121-8.
- [213] Liu TH, Lin YR, Yang KC, Chou CC, Chang YJ, Wu HP. First attack of acute urticaria in pediatric emergency department. *Pediatr Neonatol* 2008; 49:58-64.
- [214] Castillo R, Carrillo T, Blanco C, Quiralte J, Cuevas M. Hipersensibilidad a cefalópodos: características clínicas y reactividad cruzada con inhalantes. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1995; 10:183-8.
- [215] Azofra J, Lombardero M. Limpet anaphylaxis: cross-reactivity between limpet and house-dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy* 2003; 58:146-9.
- [216] Laffond E. Reacciones alérgicas por moluscos y crustáceos. *Allergol Immunopathol* 1996; 24:36-44.
- [217] Wu AY, Williams GA. Clinical characteristics and pattern of skin test reactivities in shellfish allergy patients in Hong Kong. *Allergy Asthma Proc* 2004; 25:237-42.
- [218] Nettis E, Pannofino A, Dambra P, Loria MP, Di Maggio G, Damiani E, Ferrannini A, Tursi A. IgE-mediated Urticaria/Angioedema. *Ingestion of Mussels Acta Derm Venerol* 2001; 81:62.
- [219] Lehrer SB, Marjorie L, McCants BA. Reactivity of IgE antibodies with crustacean and oyster allergens: Evidence for common antigenic structures. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80:133-9.
- [220] Lopata AL, Zinn C, Potter PC. Characteristics of hypersensitivity reactions and identification of a unique 49 kd IgE-binding protein (Hal m 1) in abalone (*Haliotis midae*). *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:642-8.
- [221] Tungtrongchitr A, Sookrung N, Chaicumpa W, Indrawattana N, Meechan T, Thavara U, Visitsunthorn N, Bunnag C. Comparison of allergenic components and biopotency in whole body extracts of wild and laboratory reared American cockroaches, *Periplaneta americana*. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2012; 30(3):231-8.
- [222] Yadzir ZH, Misnan R, Abdullah N, Bakhtiar F, Arip M, Murad S. Identification of the major allergen of *Macrobrachium rosenbergii* (giant freshwater prawn). *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2(1):50-4.
- [223] Sastre J, Iraola V, Figueredo E, Tornero P, Fernandez-Caldas E. Mites in Madrid. *Allergy* 2002; 57(1):58-9.
- [224] Burks AW, Sampson HA. Anaphylaxis and food allergy. En Metcalfe DD, Sampson HA, Simon RA. Food allergy: adverse reactions to foods and food additives, Boston: Blackwell Science; 2003:192-205.
- [225] Aas K. Fish allergy and the cod fish allergen model. In: Brostoff J, Challacombe SJ, editors. Food Allergy and Intolerance. London: Baillière Tindall, 1987: 356-66.
- [226] Cuesta-Herranz J, Lazaro M, de las Heras M, Lluch M, Figueredo E, Umpierrez A, Hernandez J, Cuesta C. Peach allergy pattern: experience in 70 patients. *Allergy* 1998; 53(1):78-82.
- [227] Daul CB, Morgan JE, Hughes J, Lehrer SB. Provocation-challenge studies in shrimp-sensitive individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81:1180-6.
- [228] Mari A, Ballmer-Weber B, Vieths S. The oral allergy syndrome: improved diagnosis and treatment. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5(3):263-73.
- [229] Carrard, A. and C. Pichler. House dust mite allergy. *Ther Umsch* 2012; 69(4):249-52.
- [230] Jeong KY, Park JW, and Hong CS. House dust mite allergy in Korea: the most important inhalant allergen in current and future. *Allergy Asthma Immunol Res* 2012; 4(6):313-25.
- [231] Ibáñez MD, Alonso E, Blanco C, Cisteró AM, Cuesta Herranz J, Fernández Rivas M y cols. (Comité de Reacciones Adversas a Alimentos de la SEAIC). Metodología diagnóstica en la alergia a alimentos. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1999; 14:50-62.
- [232] Perry TT, Matsui EC, Kay Conover-Walker M, Wood RA. The relationship of allergen-specific IgE levels and oral food challenge outcome. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(1):144-9.
- [233] Verstege A, Mehl A, Rolinck-Werninghaus C, Staden U, Nocon M, Beyer K, Niggemann B. The predictive value of the skin prick test wheal size for the outcome of oral food challenges. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(9):1220-6.
- [234] EAACI. Position paper: Allergen standardization and skin tests. *Allergy* 1993; 48(suppl 14):48-82.
- [235] Resch Y, Weghofer M, Seiberler S, Horak F, Scheibhofer S, Linhart B, Swoboda I, Thomas WR, Thalhammer J, Valenta R, Vrtala S. Molecular characterization of Der p 10: a diagnostic marker for broad sensitization in house dust mite allergy. *Clin Exp Allergy* 2011; 41(10):1468-77.
- [236] Carnés J, Ferrer A, Huertas AJ, Andreu C, Larramendi CH, Fernández-Caldas E. The use of raw or boiled crustacean extracts for the diagnosis of seafood allergic individuals. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007; 98:349-54.

- [237] Yang AC, Arruda LK, Santos AB, Barbosa MC, Chapman MD, Galvao CE, Kalil J, Morato-Castro FF. Measurement of IgE antibodies to shrimp tropomyosin is superior to skin prick testing with commercial extract and measurement of IgE to shrimp for predicting clinically relevant allergic reactions after shrimp ingestion. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:872-8.
- [238] Zheng YW, Li J, Lai XX, Zhao DY, Liu XF, Lin XP, Gjesing B, Palazzo P, Mari A, Zhong NS, Spangfort MD. Allergen micro-array detection of specific IgE-reactivity in Chinese allergy patients. *Chin Med J* 2011; 124(24):4350-4.
- [239] Dreborg S, Bousquet J, Lowenstein H, Frew AJ. Response to what is a major allergen. *Clin Exp Allergy* 1994; 24(7):610-1.
- [240] Fujimura T, Shigeta S, Kawamoto S, Aki T, Masubuchi M, Hayashi T, Yoshizato K, Ono K. Two-dimensional IgE binding spectrum of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133(2):125-35.
- [241] Akagawa M, Handoyo T, Ishii T, Kumazawa S, Morita N, Suyama K. Proteomic analysis of wheat flour allergens. *J Agric Food Chem* 2007; 55(17):6863-70.
- [242] Petersen A, Becker WM, Schlaak M. Characterization of isoforms of the major allergen Phl p V by two-dimensional immunoblotting and microsequencing. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 98(2):105-9.
- [243] Griesmeier U, Vazquez-Cortes S, Bublin M, Radauer C, Ma Y, Briza P, Fernández-Rivas M, Breiteneder H. Expression levels of parvalbumins determine allergenicity of fish species. *Allergy* 2010; 65(2):191-8.
- [244] Asero R, Mistrello G, Amato S, Ariano R, Colombo G, Conte ME, Crivellaro M, De Carli M, Della Torre F, Emiliani F, Lodi Rizzini F, Longo R, Macchia D, Minale P, Murzilli F, Nebiolo F, Quercia O, Senna GE, Villalta D. Shrimp allergy in Italian adults: a multicenter study showing a high prevalence of sensitivity to novel high molecular weight allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; 157(1):3-10.
- [245] www.allergen.org
- [246] www.pfam.sanger.ac
- [247] Ishiguro A, Homma M, Torii S, Tanaka K. Identification of *Candida albicans* antigens reactive with immunoglobulin E antibody of human sera. *Infect Immun* 1992; 60(4):1550-7.
- [248] Chou H, Tam MF, Chiang CH, Chou CT, Tai HY, Shen HD. Transaldolases are novel and immunoglobulin E cross-reacting fungal allergens. *Clin Exp Allergy* 2011; 41(5):739-49.
- [249] López I, Pardo MA. A phage display system for the identification of novel *Anisakis simplex* antigens. *J Immunol Methods* 2011; 373(1-2):247-51.
- [250] Kuehn A, Hilger C, Lehnert-Weber C, Codreanu-Morel F, Morisset M, Metz-Favre C, Pauli G, De Blay F, Revets D, Muller CP, Vogel L, Vieths S, Hentges F. Identification of enolases and aldolases as important fish allergens in cod, salmon and tuna: component resolved diagnosis using parvalbumin and the new allergens. *Clin Exp Allergy* 2013; 43(7):811-22.
- [251] Liu R, Yang E, Liu C, Xue W. Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) allergens characterized by ELISA, SDS-PAGE, 2D gels, Western blotting and MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Food Sci Nutr* 2012; 63(3):259-66.
- [252] Santos KS, Galvao CE, Gadermaier G, Resende VM, de Oliveira Martins C, Misumi DS, Yang AC, Ferreira F, Palma MS, Kalil J, Castro FF. Allergic reactions to manioc (*Manihot esculenta* Crantz): identification of novel allergens with potential involvement in latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128(6):1367-9.
- [253] Santos KS, Gadermaier G, Vejvar E, Arcuri HA, Galvão CE, Yang AC, Resende VM, de Oliveira Martins C, Himly M, Mari A, Liso M, Pomponi D, Breiteneder H, Wagner S, Kalil J, Ferreira F, Castro FF. Novel allergens from ancient foods: Man e 5 from manioc (*Manihot esculenta* Crantz) cross reacts with Hev b 5 from latex. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57(6):1100-9.
- [254] Chen YH, Hwang GY, Chen PC, Tu WC, Lee MF. Molecular cloning and immunologic characterization of For t 2: a major allergen from the biting midge *Forcipomyia taiwana*. *Allergy* 2011; 66(5):703-5.
- [255] Reese G, Viebranz J, Leong-Kee SM, Plante M, Lauer I, Randow S, Moncin MS, Ayuso R, Lehrer SB, Vieths S. Reduced allergenic potency of VR9-1, a mutant of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *J Immunol* 2005; 175(12):8354-64.
- [256] Garcia-Orozco KD, Aispuro-Hernández E, Yepiz-Plascencia G, Calderón-de-la-Barca AM, Sotelo-Mundo RR. Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International Archives of Allergy and Immunology* 2007; 144(1):23-8.
- [257] Bi XZ, Chew FT. Molecular, proteomic and immunological characterization of isoforms of arginine kinase, a cross-reactive invertebrate pan-allergen, from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(2 Supp):S226.

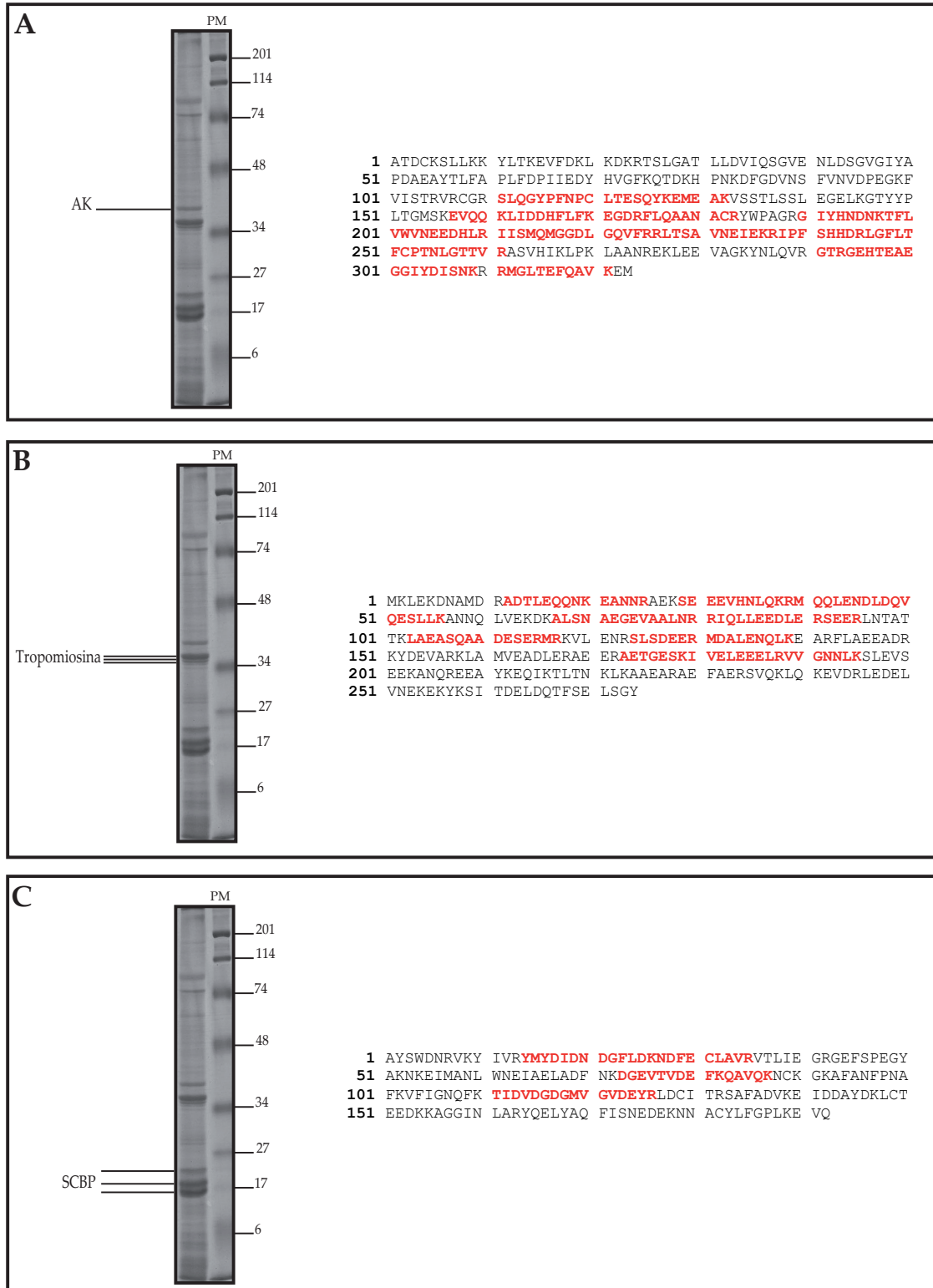
- [258] Gillis JM, Thomason D, Lefevre J, Kretsinger RH. Parvalbumins and muscle relaxation: a computer simulation study. *J Muscle Res Cell Motil* 1982; 3(4):377-98.
- [259] Poulsen LK, Hansen TK, Norgaard A, Vestergaard H, Stahl SP, Bindslev-Jensen C. Allergens from fish and egg. *Allergy* 2001; 56 (Suppl 67):39-42.
- [260] Zeldin Y, Kidon MI, Magen E, Bibi H, Cohen A, Waisel Y, Kivity S. Impact of specific allergen sensitization on the prevalence of asthma in patients with allergic rhinitis from adjacent distinct geographic areas. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 101(1):30-4.
- [261] Bemanian MH, Alizadeh Korkinejad N, Shirkhoda S, Nabavi M, Pourpak Z. Assessment of sensitization to insect aeroallergens among patients with allergic rhinitis in Yazd City, Iran. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2012; 11(3):253-8.
- [262] Platts-Mills TAE, Vervloet D, Thomas WR, Aalberse RC, Chapman MD. Indoor Allergens and Asthma. Report of the third International workshop. Cuenca, Spain, 1995.
- [263] Riedl MA, Landaw EM, Saxon A, Diaz-Sanchez D. Initial high-dose nasal allergen exposure prevents allergic sensitization to a neoantigen. *J Immunol* 2005; 174(11):7440-5.
- [264] Palomares O, Fernández-Nieto M, Villalba M, Rodríguez R, Cuesta-Herranz J. Occupational allergy in a researcher due to Ole e 9, an allergenic 1,3-beta-glucanase from olive pollen. *Allergy* 2008; 63(6):784-5.
- [265] Fernandez-Caldas E, Puerta L, Mercado D, Lockey RF, Caraballo LR. Mite fauna, Der p I, Der f I and *Blomia tropicalis* allergen levels in a tropical environment. *Clin Exp Allergy* 1993; 23:292-7.
- [266] Yu HL, Ruan WW, Cao MJ, Cai QF, Shen HW, Liu GM. Identification of physicochemical properties of *Scylla paramamosain* allergen, arginin kinase. *J Sci Food Agric* 2013; 93(2):245-53.
- [267] Leung NY, Wai CY, Shu S, Wang J, Kenny TP, Chu KH, Leung PS. Current Immunological and Molecular Biological Perspectives on Seafood Allergy: A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012; Dec 16.
- [268] Arlian LG, Morgan MS, Vyszynski-MoherDL, Sharra D. Cross-reactivity between storage and dust mites and between mites and shrimp. *Exp Appl Acarol* 2009; 47:159-72.
- [269] Chua KY, Stewart GA, Thomas WR, Simpson RJ, Dilworth RJ, Plozza TM, Turner KJ. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. *J Exp Med* 1988; 167:175-82.
- [270] Chua KY, Doyle CR, Simpson RJ, Turner KJ, Stewart GA, Thomas WR. Isolation of cDNA coding for the major mite allergen Der p II by IgE plaque immunoassay. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; 91:118-23.
- [271] Arruda LK, Vailes LD, Benjamin DC, Chapman MD. Molecular cloning of German cockroach (*Blattella germanica*) allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107:295-97.
- [272] Arruda LK, Vailes LD, Mann BJ, Shannon J, Fox JW, Vedvick TS, Hayden ML, Champman MD. Molecular cloning of a major cockroach (*Blattella germanica*) allergen, Bla g 2. Sequence homology to the aspartic proteases. *J Biol Chem* 1995; 270:19563-68.
- [273] Helm R, Cockrell G, Stanley JS, Brenner RJ, Burks W, Bannon GA. Isolation and characterization of a clone encoding a major allergen (Bla g Bd90K) involved in IgE-mediated cockroach hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98:172-80.
- [274] Ayuso R, Reese G, Leong-Kee S, Plante M, Lehrer SB. Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129(1):38-48.
- [275] Ayuso R, Lehrer SB, Reese G. Identification of continuous, allergenic regions of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *International Archives of Allergy and Immunology* 2002; 127(1):27-37.
- [276] Villalta D, Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Roncarolo D, Amato S, Mistrello G. Detection of a novel 20 kDa shrimp allergen showing cross -reactivity to house dust mites. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2010; 42(1):20-4.
- [277] Boquete M, Iraola V, Morales M, Pinto H, Francisco C, Carballás C, Carnés J. Seafood hypersensitivity in mite sensitized individuals: is tropomyosin the only responsible allergen?. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011; 106(3):223-9.
- [278] Bu G, Luo Y, Chen F, Liu K, Zhu T. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Sci Technol* 2013; 93(3):211-23.
- [279] Poms RE, Anklam E. Effects of chemical, physical, and technological processes on the nature of food allergens. *J AOAC Int* 2004; 87(6):1466-74.
- [280] Huang Y, Liu G, Cai Q, Weng W, Maleki S, Su W, Cao M. Stability of major allergen tropomyosin and other food proteins of mud crab (*Scylla serrata*) by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chem Toxicol* 2010; 48:1196-201.

- [281] Schulten V, Lauer I, Scheurer S, Thalhammer T, Bohle B. A food matrix reduces digestion and absorption of food allergens *in vivo*. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55:1484-91.
- [282] Vissers YM, Iwan M, Adel-Patient K, Stahl Skov P, Rigby NM, Johnson PE, Mandrup Müller P, Przybylski-Nicaise L, Schaap M, Ruinemans-Koerts J, Jansen AP, Mills EN, Savelkoul HF, Wichers HJ. Effect of roasting on the allergenicity of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2/6: the necessity of degranulation assays. *Clin Exp Allergy* 2011; 41(11):1631-42.
- [283] Blanc F, Vissers YM, Adel-Patient K, Rigby NM, Mackie AR, Gunning AP, Wellner NK, Skov PS, Przybylski-Nicaise L, Ballmer-Weber B, Zuidmeer-Jongejan L, Szépfalusi Z, Ruinemans-Koerts J, Jansen AP, Bernard H, Wal JM, Savelkoul HF, Wichers HJ, Mills EN. Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55(12):1887-94.
- [284] Moreno FJ. Gastrointestinal digestion of food allergens: effect on their allergenicity. *Biomed Pharmacother* 2007; 61:50-60.
- [285] Scheurer S, Lauer I, Foetisch K, San Miguel Moncin M, Retzek M, Hartz C, Enrique E, Lidholm J, Cistero-Bahima A, Vieths S. Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:900-7.
- [286] Liu GM, Huang YY, Cai QF, Weng WY, Su WJ, Cao MJ. Comparative study of *in vitro* digestibility of major allergen, tropomyosin and other proteins between Grass prawn (*Penaeus monodon*) and Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J Sci Food Agric* 2011; 91:163-170.
- [287] Piper DW, Fenton BH. pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut* 1965; 6:506-8.
- [288] Hur SJ, Lim BO, Decker E, McClements D. *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry* 2011; 125:1-12.
- [289] Pali-Schöll I, Herzog R, Wallmann J, Szalai K, Brunner R, Lukschal A, Karagiannis P, Diesner SC, Jensen-Jarolim E. Antacids and dietary supplements with an influence on the gastric pH increase the risk for food sensitization. *Clin Exp Allergy* 2010; 40(7):1091-8.
- [290] Pali-Schöll I, Jensen-Jarolim E. Anti-acid medication as a risk factor for food allergy. *Allergy* 2011; 66(4):469-77.
- [291] Flinterman AE, Akkerdaas JH, den Hartog Jager CF, Rigby NM, Fernandez-Rivas M, Hoekstra MO, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst AC, van Ree R, Pasmans SG. Lipid transfer protein-linked halzenut allergy in children from a non-Mediterranean birch-endemic area. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:423-8.
- [292] VADEMECUM. <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/o006.htm%5D>.
- [293] Campbell D, DeKruyff RH, Umetsu DT. Allergen immunotherapy: novel approaches in the management of allergic diseases and asthma. *Clin Immunol* 2000; 97:193-202.
- [294] Vassilopoulou E, Rigby N, Moreno FJ, Zuidmeer L, Akkerdaas J, Tassios I, Papadopoulos NG, Saxoni-Papageorgiou P, van Ree R, Mills C. Effect of *in vitro* gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(2):473-80.
- [295] Campana R, Vrtala S, Maderegger B, Jertschin P, Stegellner G, Swoboda I, Focke-Tejkl M, Blatt K, Gieras A, Zafred D, Neubauer A, Valent P, Keller W, Spitzauer S, Valenta R. Hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen Bet v 1 obtained by rational sequence reassembly. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126(5):1024-31.
- [296] Focke M, Swoboda I, Marth K, Valenta R. Developments in allergen-specific immunotherapy: from allergen extracts to allergy vaccines bypassing allergen-specific immunoglobulin E and T cell reactivity. *Clin Exp Allergy* 2010; 40(3):385-97.
- [297] Himly M, Jahn-Schmid B, Dedic A, Kelemen P, Wopfner N, Altmann F, van Ree R, Briza P, Richter K, Ebner C, Ferreira F. Art v 1, the major allergen of mugwort pollen, is a modular glycoprotein with a defensin-like and a hydroxyproline-rich domain. *FASEB J* 2003; 17(1):106-8.
- [298] Ball T, Linhart B, Sonneck K, Blatt K, Herrmann H, Valent P, Stoecklinger A, Lupinek C, Thalhamer J, Fedorov AA, Almo SC, Valenta R. Reducing allergenicity by altering allergen fold: a mosaic protein of Phl p 1 for allergy vaccination. *Allergy* 2009; 64(4):569-80.
- [299] Raulf-Heimsoth M, Chen Z, Rihs HP, Kalbacher H, Liebers V, Baur X. Analysis of T cell reactive regions and HLA-DR4 binding motifs on the latex allergen Hev b 1 (rubber elongation factor). *Clin Exp Allergy* 1998; 28:339-48.
- [300] Haselden BM, Syrigou E, Jones M, Huston D, Ichikawa K, Chapman MD, Kay AB, Larche M. Proliferation and release of IL-5 and IFN-g by peripheral blood mononuclear cells from cat-allergic asthmatics and rinitis, non-cat-allergic asthmatics, and normal controls to peptides derived from Fel d 1 chain 1. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 394-56.

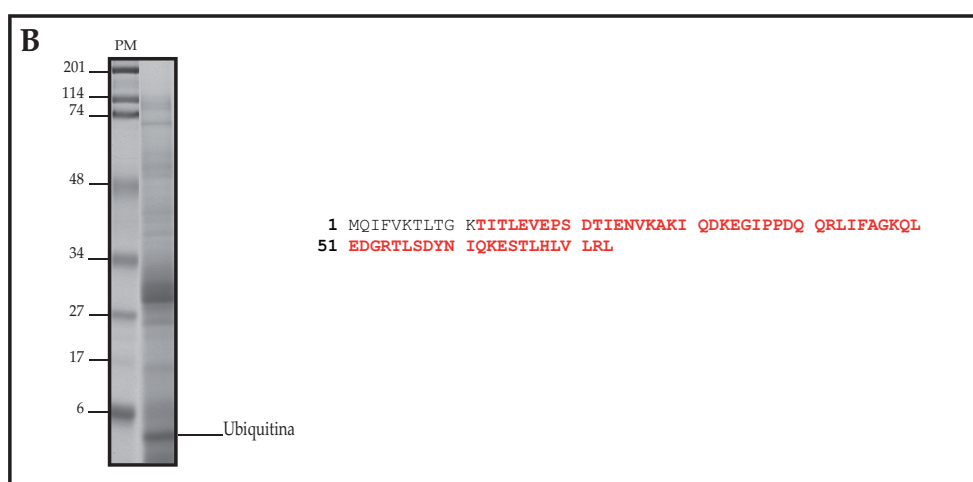
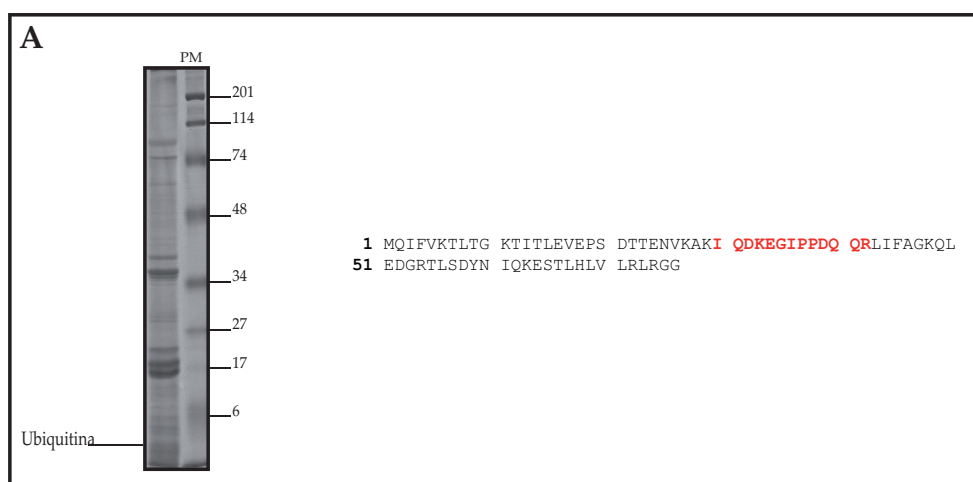
- [301] Ebner C, Schenk S, Najafian N, Siemann U, Steiner R, Fischer GW, Hoffmann K, Szépfalusi Z, Scheiner O, Kraft D. Non-allergic individuals recognize the same T cell epitopes of Bet v 1, the major birch pollen allergen, as atopic patients. *J Immunol* 1995; 154:1932-40.
- [302] Carballido JM, Carballido-Perrig N, Kagi MK, Meloen RH, Wuthrich B, Heusser CH, Blaser K. T cell epitope specificity in human allergic and non-allergic subjects to bee venom phospholipase A2. *J Immunol* 1993; 150:3582-91.
- [303] Mark PG, Segal DB, Dallaire ML, Garman RD. Human T and B cell immune response to Fel d 1 in cat-allergic and non-cat-allergic subjects. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 1316-28.
- [304] Anu K Immonen, Antti H Taivainen, Ale T O Närvänen, Tuure T Kinnunen, Soili A Saarelainen, Marja A Rytönen-Nissinen, Tuomas I Virtanen. Use of multiple peptides containing T cell epitopes is a feasible approach for peptide-based immunotherapy in Can f 1 allergy. *Immunology* 2006; 120:38-46.
- [305] Vrtala S, Akdis CA, Budak F, Akdis M, Blaser K, Kraft D, Valenta R. T cell epitope-containing hypoallergenic recombinant fragments of the major birch pollen allergen, Bet v 1, induce blocking antibodies. *J Immunol* 2000; 165(11):6653-9.
- [306] Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wüthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102(1):98-106.



Análisis de las proteínas del extracto de la gamba *S. melantho*: (A) α -actinina (99 kDa), (B) β -actina (46 kDa) y (C) FBPA (43 kDa). SDS-PAGE del extracto de la gamba *S. melantho*, señalándose cada una de las proteínas identificadas y secuencia de la proteína homóloga. (A) Secuencia de la proteína α -actinina de *Drosophila ananassae* con las secuencias de los 22 péptidos identificados en *S. melantho* resaltadas en rojo, los cuales cubren un 25% del total de la secuencia proteica de dicha proteína. (B) Secuencia de la proteína β -actina de *Cherax quadricarinatus* con las secuencias de los 13 péptidos identificados en *S. melantho* resaltadas en rojo, los cuales cubren un 35% del total de la secuencia proteica de dicha proteína. (C) Secuencia de la proteína FBPA de *Loa loa* con las secuencias de los 4 péptidos identificados en *S. melantho* resaltadas en rojo, los cuales cubren un 14% del total de la secuencia proteica de dicha proteína.



Análisis de las proteínas del extracto de la gamba *S. melanthero*: (A) ariginin kinasa (AK) (41 kDa), (B) tropomiosina (TM) (36-39 kDa) y (C) proteína sarcoplásmica de unión de calcio (SCBP) (17-24 kDa). SDS-PAGE del extracto de la gamba *S. melanthero*, señalándose cada una de las proteínas identificadas y secuencia de la proteína homóloga. (A) Secuencia de la proteína AK de *Litopenaeus vannamei* con las secuencias de los 19 péptidos identificados en *S. melanthero* resaltadas en rojo, los cuales cubren un 46% del total de la secuencia proteica de dicha proteína. (B) Secuencia de la TM de *Metapenaeus ensis* con las secuencias de los 15 péptidos identificados en *S. melanthero* resaltadas en rojo, los cuales cubren un 45% del total de la secuencia proteica de dicha proteína. (C) Secuencia de la SCBP de *Penaeus sp.* con las secuencias de los 5 péptidos identificados en *S. melanthero* resaltadas en rojo, los cuales cubren un 27% del total de la secuencia proteica de dicha proteína.



Análisis de la proteína ubiquitina (UB) (5-7 kDa) mediante MS: (A) SDS-PAGE del extracto de la gamba *S. melanthero* y secuencia de la ubiquitina de *Drosophila melanogaster*, con las secuencias de los péptidos en rojo. La secuencia del péptido identificado cubre un 17% del total de la secuencia proteica. **(B)** SDS-PAGE del extracto del ácaro *D. pteronyssinus*. Secuencia de la ubiquitina de *Bos taurus* con las secuencias de los 9 péptidos identificados resaltadas en rojo, los cuales cubren el 84% del total de la secuencia proteica de dicha proteína.

PUBLICACIONES RELACIONADAS DIRECTAMENTE CON ESTA TESIS:

Gámez C, Sánchez-García S, Ibáñez MD, López R, Aguado E, López E, Sastre B, Sastre J, del Pozo V. Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy. Allergy 2011; 66(10):1375-83.

Gámez C, Boquete M, Zafra MP, Sanz V, Mazzeo C, Ibáñez MD, Sanchez-Garcia S, Sastre J, del Pozo V. New shrimp allergens involved in mite-seafood cross-reactivity. Enviado al Ann Allergy Asthma Immunol.

Gámez C, Zafra MP, Sanz V, Mazzeo C, Ibáñez MD, Sastre J, del Pozo V. Simulated gastrointestinal digestion reduces the allergic reactivity of shrimp extract proteins and tropomyosin. Enviado al Food Chemistry.

TRABAJOS RELACIONADOS CON LA ALERGIA Y PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS DOCTORAL:

Gámez C, Marchán E, Miguel L, Sanz V, Del Pozo V. Goji berry: A potential new player in latex-food syndrome. Ann Allergy Asthma Immunol 2013; 110(3): 206-7.

Arochena L, Gámez C, del Pozo V, Fernández-Nieto M. Cutaneous allergy at the supermarket. J Investig Allergol Clin Immunol 2012; 22(6): 441-2.

Arochena L, Andregnette-Roscigno V, Gámez C, Del Pozo V, Fernández-Nieto M. Eutamias sibiricus: a new pet as a cause of asthma. Ann Allergy Asthma Immunol 2012; 108(6): 461-2.

Madero M.F., Gámez C., Madero M.A., Fernández-Nieto M., Sastre J., del Pozo V. Characterization of allergens in 4 south americans snake species. Int Arch Allergy Immunol 2009; 150 (3): 307-10.

Luengo O, Mollá R, Gámez C, Cardona V, López E, Sastre B, Waisel Y, Belmonte J, Cadahia A, Lahoz C, del Pozo V. Allergenicity and cross-reactivity of Senecio pollen: identification of novel allergens using the immunoproteomics approach. Clin Exp Allergy 2008; 38(6): 1048-60.

ORIGINAL ARTICLE

GASTROINTESTINAL DISEASES

Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy

C. Gámez^{1,2*}, S. Sánchez-García^{3,4*}, M. D. Ibáñez⁴, R. López⁵, E. Aguado³, E. López^{1,2}, B. Sastre^{1,2}, J. Sastre^{3,2} & V. del Pozo^{1,2}

¹Immunology Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz; ²CIBER de Enfermedades Respiratorias; ³Allergy Department, IIS-Fundación Jiménez Díaz; ⁴Allergy Section, Hospital Niño Jesús, Madrid; ⁵Allergy Unit, Hospital La Fe, Valencia, Spain

To cite this article: Gámez C, Sánchez-García S, Ibáñez MD, López R, Aguado E, López E, Sastre B, Sastre J, del Pozo V. Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy. *Allergy* 2011; **66**: 1375–1383.

Keywords

allergen; cross-reactivity; double-blind food challenge; dust mites; food allergy; recombinant; shrimp; tropomyosin.

Correspondence

Victoria del Pozo, PhD, Immunology Department, Fundación Jiménez Díaz, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain.
Tel.: +34-91-5504891
Fax: +34-91-5448246
E-mail: vpozo@fjd.es

*Cristina Gámez and Silvia Sánchez-García have contributed equally to this article.

Accepted for publication 12 May 2011

DOI:10.1111/j.1398-9995.2011.02663.x

Edited by: Antonella Muraro

Abstract

Background: Shrimp is a common cause of food allergy. Our aims were to determine the value of IgE antibodies in the diagnosis of shrimp allergy and to study red shrimp (*Solenocera melanthero*) tropomyosin both as a new allergen and as a cross-reactive IgE-binding protein.

Methods: We have studied 45 subjects. Skin prick test (SPT) was carried out in all subjects, and specific IgE (sIgE) to shrimp, recombinant and natural shrimp tropomyosins rPen a 1 and nPen m 1, recombinant Der p 10, and *Dermatophagoides pteronyssinus* was assessed by fluoroimmunoassay and/or immunoblotting. Double-blind, placebo-controlled food challenges were carried out to confirm diagnosis of shrimp allergy. Also, *in vitro* inhibition tests were performed to evaluate cross-reactivity.

Results: Shrimp allergy was confirmed in 18 shrimp-allergic patients. Skin prick test and IgE antibodies to shrimp were positive in all shrimp-allergic patients; sIgE to rPen a 1 was detected in 98% of these patients. Of the 18 shrimp-tolerant patients, 61% had positive SPT to shrimp, 55% were IgE-positive to shrimp, and 33% showed IgE antibodies to rPen a 1. Determination of IgE to rPen a 1 yielded a positive predictive value of 0.72 and a negative predictive value of 0.91.

Conclusion: IgE levels to rPen a 1 provided additional value to the diagnosis of shrimp allergy. Some allergens in mite extract are recognized by patients who are allergic to shrimp, though their clinical relevance remains unknown.

Shellfish allergy, including allergy to crustaceans and mollusks, is a relatively common and long-lasting disorder (1). Patients coming into contact with shellfish can experience a number of symptoms ranging from mild (e.g., allergy oral syndrome) to severe (e.g., anaphylaxis). Shrimp is the most prominent of all seafood because it is the most widely consumed and it causes the most severe reactions, even after cutaneous contact or inhalation.

The first major allergen identified in crustaceans was the muscle protein tropomyosin. Sensitization to shrimp tropo-

myosin, considered the primary allergen in shrimp, has been found in 80% of patients tested (2, 3). Tropomyosin is a 37-kDa protein associated with the actin filament of muscle cells as well as other noncontractile cells. Isoforms have been identified in several shrimp species, including *Penaeus aztecus* (Pen a 1), *Penaeus indicus* (Pen i 1), *Penaeus monodon* (Pen m 1), *Metapenaeus ensis* (Met e 1), and *Litopenaeus vanamei* (Lit v 1), with sequence identity ranging from 93% to 99%.

Tropomyosin is also considered to be responsible for cross-reactivity between other arthropods such as dust mites or cockroach (1, 4, 5). In tropomyosins from dust mites and other arthropods, sequence identity is about 75–80% (6). Therefore, the study of cross-reactivity between different tropomyosins can be useful in understanding this disorder.

Additional crustacean allergens have been characterized: the two minor cross-reactive crustacean allergens, arginine

Abbreviations

SPT, skin prick test; DBPCFC, double-blind, placebo-controlled food challenges; SAP, clinically diagnosed shrimp-allergic patients; STP, shrimp-tolerant patients; DMP, dust-mite patients; SME, *Solenocera melanthero* extract; SMST, *Solenocera melanthero* shrimp tropomyosin; DPE, *Dermatophagoides pteronyssinus* extract.

kinase (7, 8) and sarcoplasmic calcium-binding protein (9); myosin light chain, a new major shrimp allergen (10); tropomyosin C; and triosephosphate isomerase. A complete list of shrimp allergens is available at allergen databases including <http://www.allergen.org> and <http://www.allergome.com>.

Despite several articles on shrimp allergens have been published in recent years, more data and tools are required to offer accurate diagnosis and understand the evolution and prognosis of shellfish allergy. In daily clinical practice, IgE to shrimp tropomyosin Pen a 1 may be measured by fluoroimmunoassay (ImmunoCAP system; Phadia, Uppsala, Sweden). In addition, IgE to a panel of shrimp tropomyosins Pen a 1, Pen i 1, and Pen m 1 can be assessed using the ImmunoCAP ISAC, a microarray-based semi-quantitative IgE testing system which has recently become commercially available. However, IgE to tropomyosin seems to have limited specificity for shrimp allergy diagnosis (4). One of the aims of this study is to evaluate the pattern of recognition of different tropomyosins in two subsets of well-characterized individuals: patients with shrimp allergy and patients with good tolerance to shrimp, as determined by double-blind, placebo-controlled food challenges (DBPCFC), by means of IgE analysis using natural and recombinant allergens.

Methods

Design

The study was approved by the hospitals' ethics committees, and all patients/guardians provided prior written informed consent.

Patient selection

A total of 45 patients were recruited from the Allergy Departments of two hospitals (FJD and Niño Jesús). Thirty-six had a history of immediate symptoms after ingestion of shrimp that were suggestive of shrimp allergy; some were sensitized to house dust mites. Nine patients with persistent rhinitis and/or asthma presenting positive skin prick test (SPT) and/or sIgE to mites were also included. All showed tolerance to shrimp.

Skin prick tests

Skin prick tests with commercial extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus* (ALK-ABELLÓ, Madrid, Spain) and shrimp (Leti, Madrid, Spain) and prick-by-prick tests with raw red shrimp (*Solenocera melanthero*) were performed according to European guidelines (10).

Food challenges

Double-blind, placebo-controlled food challenges were performed in all patients except those confirming well-tolerated intake of shrimp in the previous 3 months. Blinded challenges consisted of increasing doses of active and placebo puddings

prepared by a hospital dietician. The pudding consisted of a milkshake made with vanilla and chocolate ice cream. *S. melanthero*, one of the most widely consumed shrimp species in Spain, was added to the active meal. Five investigators confirmed adequate blinding.

None of the subjects were lactose intolerant or allergic to any compound of the challenge material. The challenge was performed at random. Challenges were considered positive if the patients experienced identical subjective symptoms (e.g., oral allergy syndrome) to three consecutive doses. In case of a negative DBPCFC, subjects were submitted to an open food challenge, receiving a total of 12 whole-cooked shrimp. The challenge procedure was halted if a definitive reaction was provoked.

Red shrimp (*S. melanthero*), mite (*D. pteronyssinus*) extracts, natural, and recombinant purified tropomyosins

Solenocera melanthero extract (SME) was prepared as described by Ayuso et al. (9).

Dermatophagoides pteronyssinus extract was provided by Leti SA, Spain. The protein concentration was estimated according to the method of Bradford (11).

Purified natural tropomyosin from *P. monodon* (nPen m 1) and purified recombinant tropomyosin from *D. pteronyssinus* (rDer p 10) were purchased from Bial, Bilbao, Spain.

Measurement of sIgE

Specific IgE antibodies to a commercial extract of shrimp, to *D. pteronyssinus*, and to rPen a 1 were measured by fluoroimmunoassay (ImmunoCAP; Phadia).

SDS-PAGE and immunoblotting

Crude SME, *Dermatophagoides pteronyssinus* extract (DPE), nPen m 1, and rDer p 10 were separated by SDS-PAGE as described previously (12). For immunodetection of IgE-binding proteins, the separated proteins were electroblotted onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) and incubated for 18 h at 4°C with a 1/3 dilution of the sera. Bound IgE antibodies were detected using peroxidase-conjugated rabbit anti-human IgE (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) and using the ECL chemiluminescence method as recommended by the manufacturer (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

Inhibition assays

For IgE immunoblotting inhibition, a sera pool from patients 2, 7, 14, and 16 was mixed with different concentrations of inhibitor solution. After incubation at 4°C for 16 h, the mixture was used as a primary antibody. The inhibitors employed were SME, nPen m 1, rDer p 10, and bovine serum albumin (negative inhibitor). Membranes containing SME, nPen m 1, and rDer p 10 were blocked and then exposed to preabsorbed serum. Bound IgE antibodies were detected as described above.

Data analysis

Subjects' characteristics were described using descriptive statistics and expressed as mean and standard deviation. Normality was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. Comparisons of mean values between groups were made using the Wilcoxon signed-rank test, the Kruskal–Wallis test, and the Mann–Whitney *U*-test and ANOVA and unpaired *t*-test with Welch correction or *t*-test for nonparametric data and parametric data, respectively.

Associations were assessed by Pearson's correlation; chi-squared test and ANOVA were used on categorical and continuous variables, respectively. Differences were considered to be significant when $P \leq 0.05$.

Results

Patients

Clinical results are summarized in Table 1. Thirty-six individuals with suspected reaction to shrimp and nine patients sensitized to house dust mites were included. Mean age was 23.9 ± 13.9 years. Twenty-two were men and 23 women.

Shrimp allergy was assessed by DBPCFC for all food-allergic patients. Exceptions included seven cases determined by the clinicians from the two centers to be based on a medical history of severe systemic reaction upon shrimp ingestion, and another seven patients considered negative despite refusal of the challenge because they had recently tolerated shrimp in accidental ingestion. Patient 18 had developed immediate urticarial lesions after ingestion of shrimp on three occasions, and thus, he was considered positive.

According to the symptoms and the results of the DBPCFC, we classified the patients into three groups: shrimp-allergic patients (SAP), ($n = 18$); shrimp-tolerant patients (STP) ($n = 18$); and dust-mite patients (DMP) ($n = 9$). In the SAP group, 12 of 18 patients also had respiratory symptoms when exposed to dust mites, and six of 18 patients in the STP group experienced respiratory symptoms when exposed to dust mite.

Sensitization to shrimp, dust mites, and tropomyosins

The percentage of positive SPTs to shrimp across the different groups appears in Fig. 1A. All patients with clinical allergy to shrimp showed positive SPT (100%). In contrast, 61% (Specificity 0.5) of the STP and 11% of DMP had positive results, thus reaching statistical significance ($P < 0.005$ and $P < 0.01$, respectively).

Specific IgE to shrimp extract was detected in all SAP cases (100%), as compared with 55% in STP (specificity = 0.54) and 44% in DMP. These differences are significant ($P < 0.005$, Fig. 1A). Also, the mean sIgE level in the SAP group shows significantly higher values than the STP (31.8 ± 9.3 vs 2.4 ± 1.2 kU/l, $P < 0.005$) group (Fig. 1B).

Specific IgE to rPen a 1 was detected in 16 patients (89%) in the SAP group (mean 26.1 ± 8.7 kU/l). Six STP (33%) showed positive sIgE to rPen a 1 (mean 1.15 ± 0.7 kU/l, $P < 0.05$)

(Fig. 1A,B), with sensitivity of 0.88, specificity 0.77, positive predictive value 0.72, and negative predictive value 0.91.

Sixteen patients (89%) in the SAP group and 12 patients (67%) in the STP group had sIgE to *D. pteronyssinus*. Mean sIgE to DPE was 9.4 ± 2.8 vs 1.3 ± 0.5 kU/l ($P < 0.005$, Fig. 1A,B).

Four patients (44%) in the DMP group had sIgE to shrimp, seven (87%) to *D. pteronyssinus* (in one subject this test was not performed, though all had positive SPT to *D. pteronyssinus*), and none to rPen a 1 (Fig. 1A). There was a significant correlation between values of IgE to shrimp and to rPen a 1 ($r = 0.978$ $P < 0.01$) as well as values of IgE to rPen a 1 and to *D. pteronyssinus* ($r = 0.711$ $P \leq 0.01$) and to shrimp and to *D. pteronyssinus* ($r = 0.675$ $P \leq 0.01$).

SDS-PAGE and immunoblotting

SDS-PAGE of SME and DPE showed several protein bands within a molecular weight (MW) ranging between 7 and 97 kDa. The most prominent bands in the SME were around 21–24, 35, and 37–39 kDa. With respect to purified nPen m 1 and rDer p 10, a prominent band at 37 kDa was observed (Fig. 2B).

The IgE-binding ability of SME (Fig. 3A), *D. pteronyssinus* (Fig. 3B), nPen m 1 (Fig. 3C), and rDer p 10 (Fig. 3D) was evaluated by immunoblotting. All SAP (100%) showed IgE binding to a protein around 37–39 kDa, which is consistent with tropomyosin, the major allergen of shrimp. This allergen was recognized by 33.3% in the STP group and by only 11% of DMP (Fig. 4). All SAP exhibited IgE reactivity to several shrimp proteins (Fig. 3A).

By contrast, the IgE reactivity to DPE was similar across all groups. In DPE, the protein around 37–39 kDa, which corresponds to the tropomyosin of *D. pteronyssinus*, was recognized by 10/16 SAP (62.5%), 9/17 (53%) STP, and 3/9 (33%) DMP. These data showed nonsignificant differences between the three groups (Fig. 4). Among the proteins of DPE recognized by the IgE of patient sera, a 20-kDa protein band, corresponding to the major allergen Der p 2 of dust mite, was recognized by the three groups.

Among SAP, 94% showed IgE reactivity to nPen m 1 and rDer p 10 (Fig. 4); 33% of patients in the STP group recognized nPen m 1 and rDer p 10 t (Fig. 4). In the DMP group, only 22% showed IgE reactivity to nPen m 1, and no IgE binding was seen with rDer p 10 (Fig. 4).

Cross-reactivity study

Inhibition of the *S. melantho* IgE-binding proteins was already relevant when the sera pool was preincubated with 10 μ g of nPen m 1, and inhibition was nearly total with 100 μ g of nPen m 1 as inhibitor (Fig. 5A). Nevertheless, when the inhibitor extract was *S. melantho*, only 50 μ g was necessary to reach total inhibition (Fig. 5B).

Cross-inhibition studies between SME and rDer p 10 revealed that 100 μ g of rDer p 10 was not enough to achieve full inhibition of IgE binding to tropomyosin of SME (Fig. 5A), and the preincubation of the sera pool with an equal con-

Table 1 Clinical characteristics of the patients, symptoms on challenge, skin tests to shrimp, and IgE measurements

| Patient number | Sex | Age (years) | Clinical presentation | | | Definitive diagnosis | SPT | Specific IgE to shrimp | | Specific IgE to <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> kU/l | IgE to shrimp tropomyosin by immunoblot | IgE to nPen m 1 by immunoblot | IgE to rDerp10 by immunoblot | IgE to <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> by immunoblot |
|----------------|-----|-------------|-----------------------|------------|--------|----------------------|-----|------------------------|----------------|--|---|-------------------------------|------------------------------|--|
| | | | Shrimp | Dust mite | Shrimp | | | IgE kU/l | to shrimp kU/l | | | | | |
| 1 | M | 33 | SF, DM | OAS, GI | RC | P | P | 2.72 | 0.46 | 13.90 | P | P | P | P |
| 2 | F | 33 | SF, DM | AN | RC, A | NI | P | 100.0 | >100 | 46.0 | P | P | P | P |
| 3 | F | 28 | SF, DM | R, A, U | RC, A | NI | P | 7.03 | 2.03 | ND | P | P | P | N |
| 4 | M | 33 | SF, DM | AN | RC, A | NI | P | 6.15 | 2.83 | 2.27 | P | P | P | P |
| 5 | F | 16 | SF, DM | GI | RC | P | P | 5.24 | 4.34 | 26.70 | P | P | P | P |
| 6 | M | 48 | SF, DM | R, GI | R, A | P | P | 2.47 | <0.35 | 0.82 | P | N | P | P |
| 7 | M | 8 | SF, DM | U | A | NI | P | >100 | >100 | 14.1 | P | P | P | P |
| 8 | F | 43 | SF, DM | U | R | NI | P | 0.84 | <0.35 | 0.79 | P | P | P | N |
| 9 | M | 13 | SF, DM | OAS, GI, U | RC | P | P | 5.5 | 0.79 | 2.15 | P | P | P | P |
| 10 | M | 5 | SF, DM | U | RC | P | P | 50.4 | 40.3 | 10.3 | P | P | P | P |
| 11 | M | 3 | SF, DM | OAS, U | RC | P | P | 13.7 | 7.85 | 0.86 | P | P | P | P |
| 12 | M | 14 | SF, DM | A | A | P | P | 24.2 | 16.6 | 10.5 | P | P | P | N |
| 13 | F | 26 | SF | AN | NI | P | P | 5.60 | 2.60 | <0.35 | P | P | P | P |
| 14 | F | 7 | SF | U | NI | P | P | >100 | 61.8 | 11.1 | P | P | P | ND |
| 15 | M | 9 | SF | U, AE | P | P | P | 11.7 | 9.48 | 5.75 | P | P | P | N |
| 16 | F | 15 | SF | RC, U | P | P | P | 96.7 | 95.5 | 18.7 | P | P | P | ND |
| 17 | M | 7 | SF | RC | P | P | P | 0.6 | 0.41 | <0.35 | P | P | P | N |
| 18 | M | 4 | SF | U | ND | P | P | 39.8 | 25.8 | 4.57 | P | P | P | N |
| 19 | F | 36 | SF, DM | U, R | RC, A | N | N | <0.35 | <0.35 | 1.19 | P | N | N | P |
| 20 | F | 29 | SF, DM | U | RC | N | P | 0.44 | <0.35 | 0.75 | P | N | N | N |
| 21 | F | 12 | SF, DM | OAS, U | RC | ND | P | 5.98 | <0.35 | 1.56 | N | N | N | P |
| 22 | F | 18 | SF, DM | OAS | RC | N | P | 0.55 | 0.38 | 1.26 | N | P | P | P |
| 23 | F | 41 | SF, DM | RC | RC | N | P | 0.48 | <0.35 | 9.75 | N | N | N | P |
| 24 | M | 36 | SF, DM | R | RC, A | N | N | <0.35 | <0.35 | 2.03 | N | N | N | P |
| 25 | M | 31 | SF | U | U | N | P | 0.62 | <0.35 | 0.46 | N | N | N | N |
| 26 | F | 32 | SF | U, GI | N | N | N | <0.35 | <0.35 | <0.35 | N | N | N | P |
| 27 | M | 47 | SF | C, AE | N | N | N | <0.35 | <0.35 | <0.35 | N | N | N | N |
| 28 | M | 26 | SF | U, D, R | N | N | N | <0.35 | <0.35 | <0.35 | N | N | N | N |
| 29 | F | 24 | SF | U | N | N | N | <0.35 | <0.35 | <0.35 | N | N | N | N |
| 30 | F | 40 | SF | GI | N | N | P | <0.35 | <0.35 | 0.52 | N | N | N | N |
| 31 | F | 39 | SF | U | N | N | N | <0.35 | <0.35 | 0.66 | N | N | N | P |
| 32 | M | 5 | SF | RC | ND | N | N | 0.81 | 0.48 | 0.68 | P | P | P | N |
| 33 | F | 24 | SF | U | N | N | P | 2.15 | 0.71 | <0.35 | P | P | P | P |
| 34 | M | 7 | SF | GI | ND | N | P | 15.4 | 8.62 | 1.94 | P | P | P | N |
| 35 | M | 7 | SF | U, AE | N | N | P | 16.5 | 10.1 | 2 | P | P | P | N |
| 36 | F | 2 | SF | U | ND | N | P | 0.41 | 0.38 | <0.35 | N | N | N | ND |
| 37 | F | 43 | DM | | RC | N | N | <0.35 | <0.35 | <0.35 | N | N | N | N |
| 38 | M | 24 | DM | | RC, A | N | N | <0.35 | <0.35 | 3.75 | N | P | N | N |

Table 1 (Continued)

| Patient number | Sex | Age (years) | Clinical presentation | | | Shrimp DBPCFC | Definitive diagnosis | Specific IgE to shrimp | | Specific IgE to <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> kU/l | IgE to shrimp tropomyosin by immunoblot | IgE to nPen m 1 by immunoblot | IgE to rDerp10 by immunoblot | IgE to <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> by immunoblot |
|----------------|-----|-------------|-----------------------|-----------|------|---------------|----------------------|------------------------|---------------------|--|---|-------------------------------|------------------------------|--|
| | | | Shrimp | Dust mite | Dust | | | IgE to shrimp kU/l | IgE to Pen a 1 kU/l | | | | | |
| 39 | M | 26 | DM | RC | RC | N | N | 5.77 | <0.35 | ND | N | N | N | P |
| 40 | M | 15 | DM | RC | RC | N | N | 2.76 | <0.35 | 8.56 | N | N | N | N |
| 41 | F | 52 | DM | RC | RC | N | N | <0.35 | <0.35 | 0.41 | N | N | N | N |
| 42 | M | 26 | DM | RC | RC | N | N | <0.35 | <0.35 | 5.68 | N | N | N | P |
| 43 | F | 27 | DM | RC | RC | N | N | <0.35 | <0.35 | 2.36 | P | P | N | N |
| 44 | F | 34 | DM | RC | RC | ND | N | 5.92 | <0.35 | 8.16 | N | N | N | N |
| 45 | F | 29 | DM | A | A | ND | N | 1.45 | <0.35 | 60.2 | N | N | N | P |

Pathology: SF, shellfish; DM, dust mite.

Symptoms: U, urticaria; R, rhinitis; RC, rhinoconjunctivitis; OAS, oral allergy syndrome; GI, gastric intestinal; A, asthma; C, cutaneous (rash, erythema); AE, angioedema; AN, anaphylaxis.

Shrimp oral provocation: P, positive; N, negative; NI, not indicated; ND, not done.

SPT, Skin prick test; P, positive; N, negative.

Definitive Diagnosis: P, positive; N, negative.

IgE to different tropomyosins by immunoblot: P, positive; N, negative; ND, not done. DBPCFC, Double-blind, placebo-controlled food challenges.

centration of SME led to an absence of IgE reactivity to the rDer p 10-immobilized protein (Fig. 5C).

Preabsorption of the sera pool with 50 µg of nPen m 1 induced complete inhibition of IgE binding to immobilized rDer p 10 (Fig. 5C), and when rDer p 10 was used as the inhibitor allergen, total inhibition of IgE binding to immobilized nPen m 1 was not possible at a dose of 50 µg (Fig. 5B), or with 100 µg of this allergen (data not shown).

Discussion

Crustaceans – particularly shrimp – are highly allergenic foods which are responsible for food-induced reactions in both children and adults (13, 14). Diagnostic testing tools for food hypersensitivity have improved over time, but both *in vivo* and *in vitro* methods still fall short of producing accurate diagnosis (15). Double-blind, placebo-controlled food challenges is still the gold standard for the diagnosis of food allergy because it avoids false-positive diagnoses (16, 17). In our study, only 18 of 36 patients with symptoms suggestive of shrimp allergy had confirmed diagnosis of clinical allergy to shrimp; indeed, it was necessary to perform 24 DBPCFCs

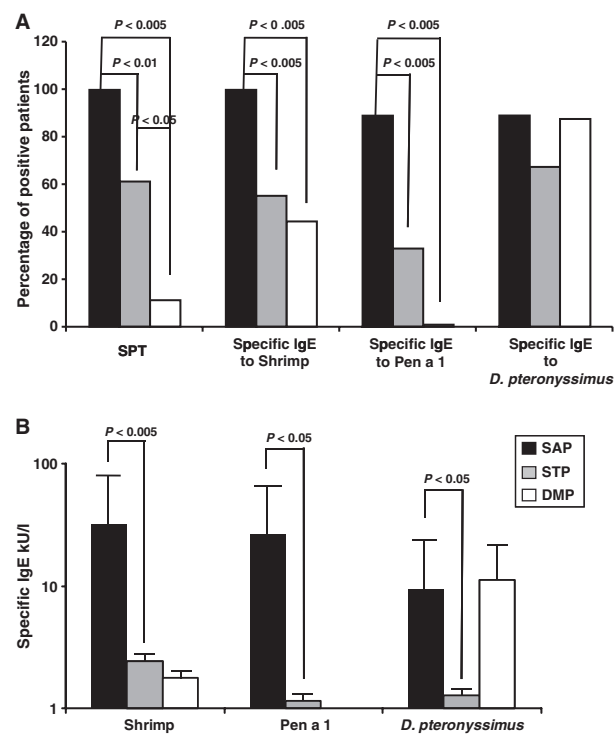


Figure 1 Percentage from different clinical analyses: Skin prick test (SPT) and specific IgE (sIgE) to shrimp extract, rPen a 1, and *D. pteronyssinus* as detected by fluoroimmunoassay. (A) Percentage of positive SPT and sIgE to shrimp extract, Pen a 1, and *D. pteronyssinus*. Significant differences are indicated in the figure. (B) Median levels of sIgE from the shrimp-allergic patients, shrimp-tolerant patients, and dust-mite patients groups. Significant differences are indicated in the figure.

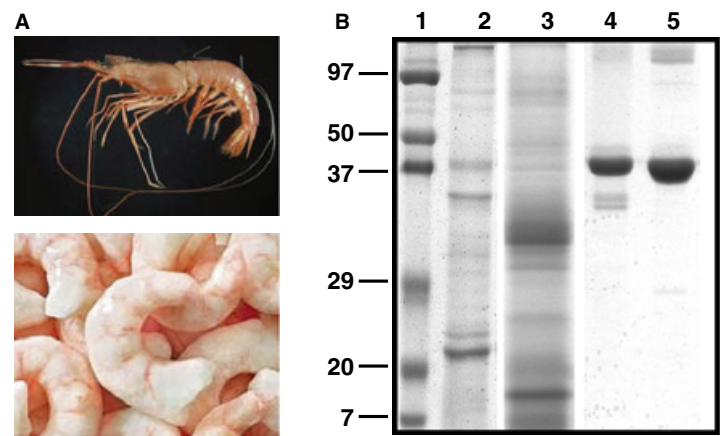


Figure 2 (A) *Solenocera melantho* picture; (B) SDS-PAGE. SDS-PAGE of *S. melantho* extract (lane 2), *Dermatophagoides pteronyssinus* extract (lane 3), purified natural tropomyosin from *Penaeus monodora* (Pen m 1) (lane 4), and purified recombinant

tropomyosin from *D. pteronyssinus* (Der p 10) (lane 5). Lane 1, molecular weight markers. The contents of loaded protein were 10 µg. The protein in SDS-PAGE was stained with colloidal Coomassie blue.

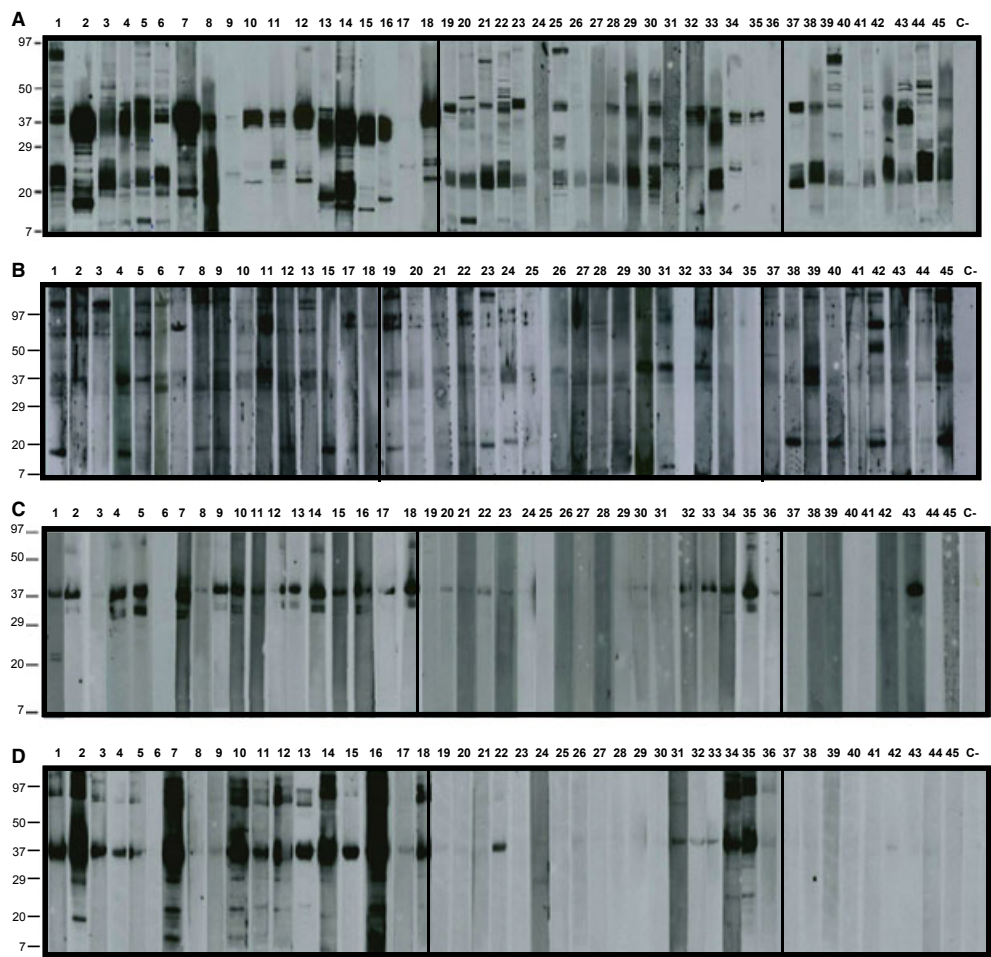


Figure 3 IgE reactivity. IgE reactivity of *Solenocera melantho* extract (3A), *Dermatophagoides pteronyssinus* extract (3B), nPen m 1 (3C), and rDer p 10 (3D) under reducing conditions. IgE reactivity

to tropomyosin is represented at 37–40 kDa. Control immunoblot experiments with the sera from the nonatopic patients did not show any IgE-binding bands.

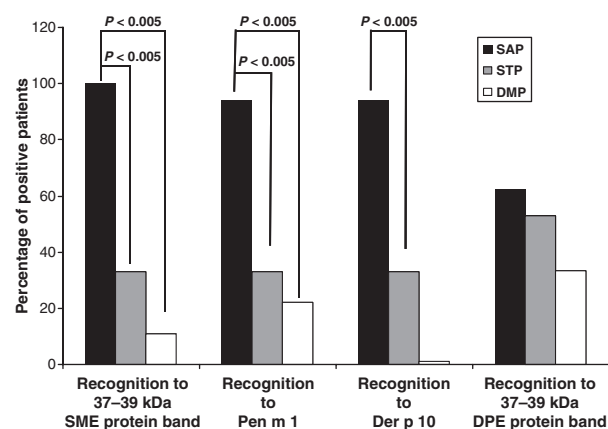


Figure 4 Percentage of positive IgE reactivity to 37- to 39-kDa *Solenocera melanthera* extract bands, Pen m 1, Der p 10, and *Dermatophagoides pteronyssinus* from three groups of patients. For 37- to 39-kDa SME bands and Pen m 1, the percentage of recognition in shrimp-allergic patients (SAP) is higher than in the shrimp-tolerant patients (STP) and dust-mite patients groups. The percentage of recognition to Der p 10 shows significant differences between the SAP and STP groups. Among the three groups, there are no significant differences in recognition to 37- to 39-kDa *D. pteronyssinus* bands.

because prick-prick or sIgE to shrimp was positive in 28 patients. Oral challenges always entail a risk and are time-consuming. Therefore, any tool that helps clinicians avoid this procedure is welcome. Some studies have suggested high-

risk cutoffs of sIgE to cow's milk, egg, peanut, soy, and wheat (18, 19), but no data have been published on shrimp to date.

In our population, SPT to shrimp was positive in 100% of the SAP group and in 61% of the STP group, a finding that corroborates the high sensitivity of this test but its low specificity (around 50%). Similar levels of sensitivity are maintained when measuring sIgE to rPen a 1, but its specificity was higher (77% vs 50%). Our study failed to determine a sIgE cutoff value for shrimp extract which was able to predict shrimp challenge results. However, patients from the SAP group had significantly higher values of sIgE to shrimp. Therefore, diagnosis of shrimp allergy is still a challenge for clinicians, particularly for patients with positive skin test or sIgE to shrimp with or without previous reaction to shrimp.

It has recently been reported that detection of IgE to shrimp tropomyosin is linked to the presence of clinical shrimp allergy in a Brazilian population (20). The authors found that a positive history associated with a positive result for IgE to shrimp tropomyosin resulted in positive oral challenge in 100% of patients, but two of eight tropomyosin-negative patients had positive oral challenge to shrimp. Likewise, a negative history associated with a negative test result for IgE to shrimp tropomyosin was always associated with a negative challenge result. We obtained similar results when measuring IgE to rPen a 1 by fluoroimmunoassay, as results were positive in all the SAP except 2 (6 and 8). Patient 6, despite being negative to rPen a 1 obtained by fluoroimmunoassay and to nPen m 1 by immunoblotting, presents sIgE to shrimp extract under both techniques. We therefore cannot rule out

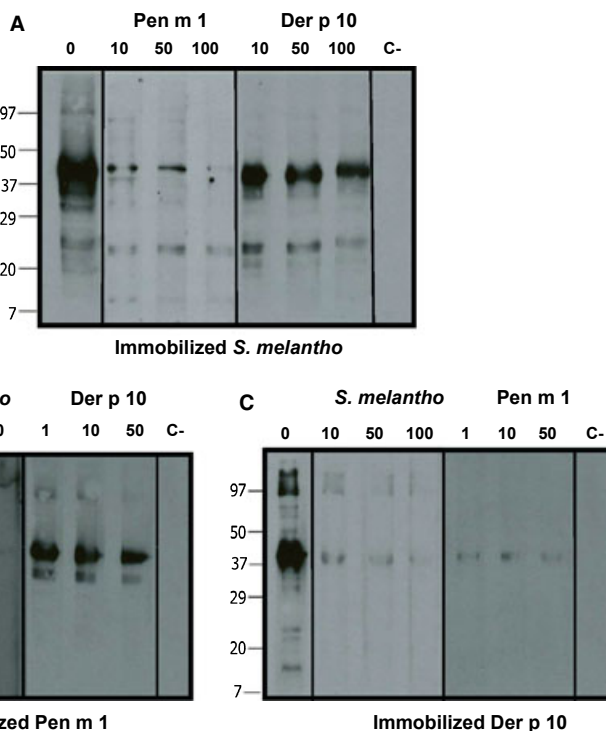


Figure 5 Immunoblot inhibition. Immunoblot inhibition of IgE to *Solenocera melanthera* by Pen m 1 and Der p 10 (A). Immunoblot inhibition of Pen m 1 IgE by *S. melanthera* extract (SME) and Der p 10 (B). Immunoblot inhibition of Der p 10 IgE by SME and Pen m 1 (C). Sera were pre-absorbed with different quantities (μ g) of SME or tropomyosins as described on top of each figure. Lane 0 corresponds to preincubation of sera with 50 μ g of bovine serum albumin. C represents control sera of a nonatopic subject.

the possibility that the patient's shrimp allergy was because of sensitization to other allergens like arginine kinase, whose MW resembles that of tropomyosin. As seen here, it would be beneficial to have the whole panel of identified shrimp allergens available for testing. Moreover, identification of allergenic epitopes by microarray would help define the risk level of being clinically allergic (21).

This study characterizes *S. melanthero* shrimp as an allergenic source, and the data suggest that *S. melanthero* presents tropomyosin as an important allergen. Further studies including purification strategies and sequencing would be necessary to better characterize *Solenocera melanthero* shrimp tropomyosin (SMST) and other relevant allergens from this source.

Owing to high cross-reactivity between nPen m 1 and SMST, we define a potential use of different recombinant tropomyosins as a marker of sensitization and clinical reactivity.

Cross-reactivity among tropomyosins from dust mite and *S. melanthero* shrimp is demonstrated in this study based on inhibition assays using pooled sera from SAP. It has been suggested that tropomyosin is a cross-reacting allergen between foods and aeroallergens of animal origin, such as dust mite or cockroach. IgE reactivity to shrimp has been demonstrated in an unexposed population of subjects allergic to mite and/or cockroaches (5), and, conversely, a study has suggested that sensitization to shrimp tropomyosin can cause allergy to mite and *Blattella germanica* (22). Our results from inhibition assays indicate that similar epitopes of *S. melanthero* shrimp and dust-mite tropomyosin are involved in IgE recognition, but further studies on the peptide sequence and tertiary structure of common epitopes should further elucidate the molecular mechanism of IgE cross-reactivity (4, 23).

In the SAP group, there are more subjects with respiratory allergy to dust mite (12/18) than in the STP group (6/18); this could be attributed to the role of several proteins that were recognized by the patients' IgE as observed by immunoblotting with SME and DPE. None of the patients with respiratory allergy to dust mites have positive results detected by fluoroimmunoassay to rPen a 1; however, in two of nine subjects in this group, IgE-binding bands were detected by immunoblotting to nPen m 1, but no patients presented IgE binding to rDer p 10. The failure to recognize Der p 10 is surprising when considering positive nPen m 1; however, the sequence identity of shrimp tropomyosin and Der p 10 is approximately 80%. It may be possible that these molecules have species- sIgE epitopes. This idea is supported by the fact that Der p 10 inhibited only partially the IgE binding of the sera pool to shrimp

tropomyosins. It could be beneficial to do the same analysis on a patient-by-patient basis.

In most DMP living in Europe and in the United States, sensitization to mite tropomyosins is not important to the sensitization process (24–28). Here, we must highlight that tropomyosin appears in low concentration in mites (29). Even though lower levels of this protein are present in mites than in crustaceans, a study in Africa revealed that IgE recognition frequency to rDer p 10 can be significant (55%), which may reflect sensitization to the cross-reactive allergen tropomyosin present in parasites (30).

In conclusion, this study demonstrates that measurements of IgE levels to shrimp tropomyosin (rPen a 1) provide added diagnostic value to the methods currently available – SPT or sIgE to shrimp – for confirmation of shrimp allergy in patients with suspected reactions in a European population. Nevertheless, we must keep in mind that specificity of IgE to rPen a 1 is 0.77; thus, oral challenge testing may be necessary in some patients. Furthermore, we reported SMST as an allergen, demonstrating its high cross-reactivity with mite tropomyosin.

Acknowledgments

This study was supported by Mútua Madrileña, Red RESPIRA C03/011, CIBER grants from Spain's Health Research Fund (Fondo de Investigaciones Sanitarias – FIS), and SEAIC (Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica).

Authors' contributions

VdP and JS conceived of the study, designed and planned the experiments, participated in the analysis of the data, and wrote significant sections of the manuscript; CG carried out the immunological study, performed the analysis and interpretation of the data, and helped to write the manuscript; patients' recruitment and diagnosis were performed by SG, and MDI helped to draft the manuscript; EA and RL performed SDS-PAGE; EL and BS performed the inhibition procedures. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest

Joaquín Sastre is consultant to Phadia, Mundipharma, Merck, GSK, and Stallergens; having been paid lecture fees by Novartis, GSK, Stallergenes, Merck, and UCB; and having received grant support from Phadia, GSK, and ALK-Abello. The rest of authors declare that they have no competing interests.

References

1. DeWitt AM, Mattsson L, Lauer I, Reese G, Lidholm J. Recombinant tropomyosin from *Penaeus aztecus* (rPen a 1) for measurement of specific immunoglobulin E antibodies relevant in food allergy to crustaceans and other invertebrates. *Mol Nutr Food Res* 2004;**48**:370–379.
2. Reese G, Schick Tanz S, Lauer I, Randow S, Lüttkopf D, Vogel L et al. Structural, immunological and functional properties of natural recombinant Pen a 1, the major allergen of Brown Shrimp, *Penaeus aztecus*. *Clin Exp Allergy* 2006;**36**:517–524.
3. Albrecht M, Alessandri S, Conti A, Reuter A, Lauer I, Vieths S et al. High level expres-

- sion, purification and physico- and immunochemical characterisation of recombinant Pen a 1: a major allergen of shrimp. *Mol Nutr Food Res* 2008;**52**(Suppl. 2):S186–S195.
4. Ayuso R, Reese G, Leong-Kee S, Plante M, Lehrer SB. Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;**129**:38–48.
 5. Fernandes J, Reshef A, Patton L, Ayuso R, Reese G, Lehrer SB. Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. *Clin Exp Allergy* 2003;**33**:956–961.
 6. Santos AB, Chapman MD, Aalberse RC, Vailes LD, Ferriani VP, Oliver C et al. Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1999;**104**:329–337.
 7. Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, Chow LP. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J Immunol* 2003;**170**:445–453.
 8. García-Orozco KD, Aispuro-Hernández E, Yepiz-Plascencia G, Calderón-de-la-Barca AM, Sotelo-Mundo RR. Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;**144**:23–28.
 9. Ayuso R, Grishina G, Bardina L, Carrillo T, Blanco C, Ibáñez MD et al. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**122**:795–802.
 10. EAACI Subcommittee on Skin Tests. Allergen standardization and skin tests. *Allergy* 1993;**48**:48–82.
 11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**:248–254.
 12. Luengo O, Mollá R, Gómez C, Cardona V, López E, Sastre B et al. Allergenicity and cross-reactivity of senecio pollen: identification of novel allergens using immunoproteomics approach. *Clin Exp Allergy* 2008;**28**:1048–1060.
 13. Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Prevalence of seafood allergy in the US determined by a random telephone survey. *J Allergy Clin Immunol* 2004;**114**:159–165.
 14. Wild LG, Lehrer SB. Fish and selfish allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005;**5**:74–79.
 15. Beyer K. Characterization of allergenic food proteins for improved diagnostic methods. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;**3**:189–197.
 16. Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, Blanco C, Ebner C, Hourihane J et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods – position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 2004;**59**:690–697.
 17. Bock SA, Sampson HA, Atkins FM, Zeiger RS, Lehrer S, Sachs M et al. Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: a manual. *J Allergy Clin Immunol* 1988;**82**:986–997.
 18. Reibel S, Röhr C, Ziegert M, Sommerfeld C, Wahn U, Niggemann B. What safety measures need to be taken in oral food challenges in children? *Allergy* 2000;**55**:940–944.
 19. Perry TT, Matsui EC, Conover-Walker MK, Wood RA. Risk of oral food challenges. *J Allergy Clin Immunol* 2004;**114**:1164–1168.
 20. Yang AC, Arruda LK, Santos AB, Barbosa MC, Chapman MD, Galvão CE et al. Measurement of IgE antibodies to shrimp tropomyosin is superior to skin prick testing with commercial extract and measurement of IgE to shrimp for predicting clinically relevant allergic reactions after shrimp ingestion. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**125**:872–878.
 21. Ayuso R, Sánchez-García S, Lin J, Fu Z, Ibáñez MD, Carrillo T et al. Greater epitope recognition of shrimp allergens by children than adults suggests that shrimp sensitization decreases with age. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**125**:1286–1293.
 22. Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;**119**:247–258. Review.
 23. Lind P. Purification and partial characterization of two major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* 1985;**76**:753–761.
 24. Chua KY, Stewart GA, Thomas WR, Simpson RJ, Dilworth RJ, Plozza TM et al. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. *J Exp Med* 1988;**167**:175–182.
 25. Chua KY, Doyle CR, Simpson RJ, Turner KJ, Stewart GA, Thomas WR. Isolation of cDNA coding for the major mite allergen Der p II by IgE plaque immunoassay. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;**91**:118–123.
 26. Arruda LK, Vailes LD, Benjamin DC, Chapman MD. Molecular cloning of German cockroach (*Blattella germanica*) allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;**107**:295–297.
 27. Arruda LK, Vailes LD, Mann BJ, Shannon J, Fox JW, Vedvick TS et al. Molecular cloning of a major cockroach (*Blattella germanica*) allergen, Bla g 2. Sequence homology to the aspartic proteases. *J Biol Chem* 1995;**270**:19563–19568.
 28. Helm R, Cockrell G, Stanley JS, Brenner RJ, Burks W, Bannon GA. Isolation and characterization of a clone encoding a major allergen (Bla g Bd90K) involved in IgE-mediated cockroach hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1996;**98**:172–180.
 29. Arlian LG, Morgan MS, Vyszynski-Moher DL, Sharra D. Cross-reactivity between storage and dust mites and between mites and shrimp. *Exp Appl Acarol* 2009;**47**:159–172.
 30. Westritschnig K, Sibanda E, Thomas W, Auer H, Aspöck H, Pittner G et al. Analysis of the sensitization profile towards allergens in central Africa. *Clin Exp Allergy* 2003;**33**:22–27.

CURRICULUM VITAE

Cristina Gámez

Date of Birth: 12/08/80

Personal address: Boltaña, 46, 3ºA. 28022, Madrid, Spain

e-mail: cgamezbis@gmail.com

ACADEMIC TITLES

2005 Bachelor's degree (Biology)

Universidad Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

2009 Master's degree (Immunology)

Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

PROFESSIONAL TRAINING

2007 "Formation in radiological protection for investigation laboratories."

2007 "Expression and purification of recombinants proteins." Parasitology and Biomedicine Institute "López Neyra" and Biomedal.

2004 "Research and Development in Pharmaceutical Industry." pHentus.

EXPERIENCE

October 2011- Research Stay in Division of Immunopathology Department of

January 2012 Pathophysiology and Allergy Research Center of

Pathophysiology, Infectiology and Immunology Medical University of Vienna,
Austria

2008-2013 PhD student in the Immunology Department. IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

2006-2007 R&D and Quality Control Department. Applied Molecular Development. S.A.
Group Alerpharma S.A., Madrid.

2006 Scholar in the R&D Department. DIATER Laboratories, Madrid.

2002 & 2003 (summer time). Production Department. ROVI Laboratories, Madrid.

LANGUAGES

English: advanced level.

French: advanced level.

PUBLICATIONS

• **Gámez C**, Marchán E, Miguel L, Sanz V, del Pozo V. Goji berry: A potential new player in latex-food syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2013; 110(3):206-7.

• Arochena L, **Gámez C**, del Pozo V, Fernández-Nieto M. Cutaneous Allergy at the Supermarket. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012; 22(6): 441-2.

- Arochena L, Andregnette-Roscigno V, **Gámez C**, Del Pozo V, Fernández-Nieto M. Eutamias sibiricus: a new pet as a cause of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2012 Jun; 108(6): 461-2.
- López E, Zafra MP, Sastre B, **Gámez C**, Fernández-Nieto M, Sastre J, Lahoz C, Quirce S, Del Pozo V. Suppressors of cytokine signaling 3 expression in eosinophils: regulation by PGE₂ and Th2 cytokines. *Clin Dev Immunol*. 2011; 2011: 917915.
- **Gámez C**, Sánchez-García S, Ibáñez MD, López R, Aguado E, López E, Sastre B, Sastre J, del Pozo V. Tropomyosin IgE positive results are a good predictor of shrimp allergy. *Allergy*. 2011; Oct; 66(10): 1375-83.
- Sastre B, Fernández-Nieto M, López E, **Gámez C**, Aguado E, Quirce S, del Pozo V, Sastre J. PGE₂ decreases muscle cell proliferation in patients with non-asthmatic eosinophilic bronchitis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2011; 95(1-4):11-8.
- López E, Zafra MP, Sastre B, **Gámez C**, Lahoz C, del Pozo V. Gene expression profiling in lungs of chronic asthmatic mice treated with Galectin-3: down-regulation of inflammatory and regulatory genes. *Mediators Inflamm*. 2011; 2011:823279.
- Madero M.F., **Gámez C**., Madero M.A., Fernández-Nieto M., Sastre J., del Pozo V. Characterization of allergens in 4 south americans snake species. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2009; 150 (3): 307-10.
- Luengo O, Mollá R, **Gámez C**, Cardona V, López E, Sastre B, Waisel Y, Belmonte J, Cadahia A, Lahoz C, del Pozo V. Allergenicity and cross-reactivity of Senecio pollen: identification of novel allergens using the immunoproteomics approach. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(6): 1048-60.

INTERNATIONAL CONGRESS

- **69th Annual Meeting. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. February 22-26, 2013. San Antonio. Texas.**
 - * **Poster Session 2206: Food Allergens/Food Disease Epi/Insect Hypersensitivity.** "New Allergens Involved in Shrimp-Mite Cross Reactivity". C. Gámez, V. del Pozo, M. Boquete, J. Sastre.
- **XXX Congress of the European Academy Allergology and Clinical Immunology. June 2011 Istabul, Turkey.**
 - * **Poster Session 43. Novel mechanisms: what do mouse models tells us?.** "Profiling of genes expressed in lungs of chronic asthmatic mice treated with galectin-3: down-regulation of inflammatory and regulatory genes". MP Zafra, López E, Sastre B, **Gámez C**, Lahoz C, del Pozo V. *Allergy* 2011; Volume 66, Issue Supplement s94:445.
- **XXIX Congress of the European Academy Allergology and Clinical Immunology. June 2010, London, UK.**
 - * **Oral Session 20. Molecular allergology enters the 'omics' era.** "Senecio jacobaea: major allergens identification by immunoproteomic approach". **Gámez C**, Luengo O, López E, Sastre B, Lahoz C, del Pozo V. *Allergy* 2010; 65 (Suppl. 2): 53.

- **66th Annual Meeting American Academy of Allergy, Asthma & Immunology.**

February 26-March 2, 2010 New Orleans

* **Poster:** "PGE2 may decrease airway inflammation and muscular hyperplasia in eosinophilic bronchitis patients through prostanoid receptors EP2 and EP4". Sastre B, Fernández-Nieto M, López E, **Gámez C**, Aguado E, Quirce S, Sastre J, del Pozo V. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125 (Suppl. 1); AB44.

- **2nd European Congress of Immunology. September 13 - 16, 2009 Berlin, Germany.**

* **Poster:** "Identification and characterization the allergens of *Senecio jacobaea* pollen". **Gámez C**, Luengo O, López E, Sastre B, Aguado E, Lahoz C, del Pozo V.

- **XXVIII Congress of the European Academy Allergology and Clinical Immunology. June 6-10, 2009 Warszawa, Poland**

Poster Discussion 7. Allergic Immune Responses. "Prostaglandin E2 may decrease airway inflammation and muscular hyperplasia in eosinophilic bronchitis patients through prostanoid receptors EP2 and EP4". Sastre B, Fernández-Nieto M, López E, **Gámez C**, Aguado E, Quirce S, Sastre J, del Pozo V. *Allergy* 2009; 64 (Suppl. 90): 135-136 (F.I. 5.014).

- **65th Annual Meeting. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology.**

March 13-17, 2009 Washington DC.

- "SOCS-3 expression in eosinophils and CD4 T cells regulates inflammation in Th2 respiratory disorders". López E, Sastre B, **Gámez C**, Fernández-Nieto M, Sastre J, Lahoz C, Quirce S, del Pozo V. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: S55.

- "Allergy to shrimp: a double blind, placebo-controlled, food challenge study and allergens implicated in Spain". Sánchez-García S, **Gámez C**, López E, Ibáñez M.D, Escudero C, Madero MF, Laso MT, del Pozo V, Sastre J. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: S23.

- **XXVII Congress of the European Academy Allergology and Clinical Immunology. June 7-11, 2008 Barcelona, Spain.**

***Oral Session 14. Advances in occupational allergy.** "Inflammatory markers in induced sputum during specific inhalation challenges with occupational agents". Fernández-Nieto M, Sastre B, Quirce S, López E, del Álamo C, **Gámez C**, del Pozo V, Sastre J. *Allergy* 2008; 63 (Suppl. 88): S38.

- **XXVII 3rd Internacional Symposium on Molecular Allergology. Allergens: from identification to therapy. April 2008 Salzburg, Austria.**

* **Poster:** "Allergenicity and cross-reactivity of senecio pollen: Identification of novel allergens using immunoproteomics approach". Luengo O, Molla R, **Gámez C**, Cardona V, López E, Sastre B, Lahoz C, del Pozo V.

NATIONAL CONGRESS

- **XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. Madrid. 10-13 Noviembre 2010**

* **Comunicaciones orales. Alergia a Alimentos VI.** "Estudio doble ciego: papel de la tropomiosina y su reactividad cruzada en la alergia a la gamba y ácaros". **Gámez C**, Sánchez-García S, Aguado E, López E, del Pozo V, Sastre J. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010; 20 (Suppl.2):125.

• XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Palma de Mallorca. Mayo 2008

* **Pósters. Sesión 5: Inmunodeficiencias. Alergia y complemento.** "Incremento de los niveles de PGE2 en las vías aéreas de pacientes con bronquitis eosinofílica". Sastre B, Fernández-Nieto MM, López E, **Gámez C**, del Álamo C, Sastre J, Quirce S, del Pozo V. *Inmunología* 2008; 27 (Suppl. 1); 75-76.

* **Comunicaciones orales. Sesión 5. Inmunodeficiencias: alergia y complemento.**

- "Estudio de la expresión de proteínas SOCS en linfocitos CD4+ y eosinófilos de pacientes con patología respiratoria". López Cernada ME, Sastre B, **Gámez C**, Chacártegui M, del Álamo C, Cárdena B, Palomino P, Lahoz C, del Pozo V. *Inmunología* 2008; 27 (Suppl. 1); 29.

- "Identificación y caracterización de los alérgenos del extracto del polen de *Senecio jacobea*". **Gámez C**, Luengo O, Mollá R, López E, Sastre B, Lahoz C, del Pozo V. *Inmunología* 2008; 27 (Suppl. 1); 30.

